

LC|GC

효율적인 액체 크로마토그래피(LC) 운용을 위한 최선의 실천방법

2019년 2월



LC 시스템 최대한 활용하기 Mia Summers & Andreas Kugler



LC 컬럼 특성 제대로 이용하기 Anne Mack



우수한 LC 분석법을 훨씬 향상하기 William Long

스폰서





LC 및 LC/MSD 워크플로 효율성을 극대화하기

Agilent InfinityLab은 LC 기기, 질량 분석기, 컬럼 및 소모품 등이 조화를 이루는 최적화된 포트폴리오입니다. 일상적인 분석에서 첨단 연구까지, InfinityLab은 귀하의 실험실을 도와 비용을 줄이고 예전보다 더 높은 효율성을 성취할 수 있습니다.

InfinityLab 제품과 Agilent OpenLab 소프트웨어 및 Agilent CrossLab 서비스를 통해, 애질런트는 엔드-투-엔드 솔루션을 제공하여 귀하 실험실의 일상적인 분석 생산성을 높일 수 있도록 지원을 제공합니다.

최적의 분석 성과 확보에 대해 자세히 알아보십시오.

www.agilent.com/chem/infinitylab



Agilent

Trusted Answers

서론 더

우수하고, 더 빠르며, 더 신뢰성 있는 결과를 얻는 것은 바쁜 실험실의 최대 관심사이며, 그 중 많은 실험실에서 효율성 향상을 위한 새로운 방법을 흔히 찾고 있습니다. 가장 신뢰성 있는 결과와 보다 효율적인 실험실 운영을 보장할 수 있는 새로운 기술에는 무엇이 있을까요?

이 ebook은 *효율적인 액체 크로마토그래피(LC) 운용을 위한 최선의 실천방법*을 주제로 실험실 효율성을 즉시 향상시킬 수 있는 간단한 기술에 대해 다룹니다.

우선, Mia Summers와 Andreas Kugler는 적절한 예방 점검 서비스를 통해 일반적으로 발생하는 많은 문제를 피하는 방법과, 그러한 문제의 진단 및 해결 과정의 시간을 절약하고 어려움을 감소시킬 수 있는 체계적인 접근방법을 소개합니다. 이는 올바른 컬럼 선택에서부터 자동 시료 주입기와 주입기 및 오염된 용매의 징후에 이르는 모든 내용을 포함합니다.

그 다음, 애질런트 테크놀로지스의 Anne Mack과 함께 분석법 개발의 어려움에 대해 짚어보고, 분석법 개발 과정에서 분리 목적을 유지하는 것의 중요성을 살펴봅니다. 또한 입자 공극 크기, 입자 기술, 입자 자체의 실제 크기 등을 포함하여 LC 컬럼 선택 시 고려해야 하는 물리적 특성을 함께 설명합니다.

끝으로, 애질런트 테크놀로지스의 William Long으로부터 새로운 컬럼 기술을 적용하는 것과 같은 간단한 조정이 어떻게 기존 분석법의 많은 경우에서 분리능을 향상시키고, 피크 모양을 개선하여 해당 분석법이 재현성 있고, 신뢰성 있는(심지어 기존보다 향상된) 결과를 제공할 수 있도록 하는지를 배울 수 있습니다.

스폰서 콘텐츠

LC 시스템 최대한 활용하기

Mia Summers & Andreas Kugler

stock.adobe.com 라이선스 이미지

개요

현대의 액체 크로마토그래피(LC)는 성숙한 기술이지만, 분석 과정에서의 문제는 여전히 발생할 수 있습니다. 일단 문제가 발생하면, 매우 힘들어지게 될 수 있습니다. 이는 특히 누출, 기포, 막힘과 같은 시스템 고장을 처리할 때 더욱 그렇습니다. 게다가 크로마토그래피적인 문제를 진단하는 경우에는 시간을 한없이 소모하는 경험을 하게 될 수도 있습니다. 다행히, 적절한 예방 점검 서비스는 일반적으로 발생하는 많은 문제를 피할 수 있게 해주고, 이에 대한 체계적 접근을 통해 문제의 진단과 해결 과정의 시간을 절약하며, 어려움을 완화할 수 있습니다.

이동상

깨끗한 이동상을 사용하는 것은 LC 시스템이 높은 재현성과 신뢰성으로 작동하도록 하기 위해 필수적입니다.

원칙과 타협하고 싶은 이유가 있다 하더라도, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 등급 또는 질량 분석(MS) 등급의 용매를 사용하는 것이 시스템 오염이나 예상치 못한 피크 및 재분석 과정 등을 줄일 수 있기 때문에, 장기적으로

보면 실험실의 시간과 비용을 절약할 수 있습니다.

용매 오염의 징후로는 고스트 피크, 베이스라인 드리프트, 역압 상승, 탈기장치의 빈번한 고장 발생 혹은 비정상적으로 짧은 컬럼 수명 등이 있을 수 있습니다. 그 중 고스트 피크는 종종 용매 오염에 대한 첫 번째 징후입니다. 고스트 피크는 크로마토그램에서 계속 이동하거나, 나타났다가 사라지는 듯한 피크 형태로 나타납니다. 이는 시스템에 축적된 저농도 이동상 또는 시료 관련 불순물의 결과일 수 있으며, 서로 다른 시간에 일관성 없이 용리되고, 때때로 주입 용매나 그레디언트 조건에 의해 유발되는 경우가 있습니다. 또한 백그라운드 오염물질의 파장 검출을 상쇄하는 시료 주입에 의해 이동상 내 오염물질의 연속적인 베이스라인이 방해를 받는 경우, 고스트 피크는 네거티브 피크로 나타날 수 있습니다.

일부 고스트 피크는 시스템이나 이동상 오염이 아닌 분석 조건 때문에 발생하기도 합니다. 가장 가능성이 높은 원인은 시료에 대한 분석 시간이 너무 짧아, 각 주입에서 늦게 용리되는 일부 성분이 후속 크로마토그램에 나타나는 것입니다. 시료 혼합물의 모든 성분이



컬럼으로부터 제 때에 용리되지 않으면, 이들 성분은 컬럼에 잔류하여 후속 주입에서 느리고 일관성 없이 용리됩니다. 이러한 경우가 의심된다면, 컬럼을 높은 유기 성분 비율의 역상 이동상으로 플러싱한 다음, 분석 조건으로 여러 번 바탕 분석(blank run)을 수행하여 컬럼을 플러싱 해주어야 합니다. 최종적으로는, 분석 시간을 (분석법에서 설정했던 것 보다)연장한 단일 주입을 수행하여 모든 피크가 프로그래밍된 분석 시간 내에 용리되는 지를 검증해야 합니다.

이동상 내의 작은 입자는 탈기장치 고장, 펌프 씰(seal) 또는 피스톤 손상 등 LC 구성 요소에 심각한 문제를 일으킬 수 있습니다. 입자성 물질은 일반적으로 완충액 염의 오염 또는 용매 조건의 부주의한 고려로 발생한 침전에 기인합니다. 그레디언트 시스템에서 완충액을 사용할 때는, 완충액이 더 이상 용해되지 않을 만큼의 높은 유기 용매 농도까지 사용해서는 안됩니다.

고형물을 용해하여 제조한 모든 이동상 구성은 공극 0.45 μ m 이하의 필터로 여과해야 하며, 용매와 호환되는 필터 멤브레인 재질을 사용하도록 주의를 기울여야 합니다. 용존 고형물 또는 염을 포함한 이동상을 LC 시스템에서 사용하고 나면, 분석 완료 후 이를 확실하게 제거하기 위해 물로 플러싱하는 과정이 필요합니다. 다음 분석 시, 그냥 다른 용매 시스템으로 전환하면 침전이 일어날 수 있습니다. 용매 시스템을 전환할 때는 언제나 섞임성(miscibility)을 유지하는 것도 매우

중요합니다. 이를 위한 최선의 방법은 원하는 이동상에, 사용할 이동상과 잘 섞일 수 있는 중간 용매로 먼저 넘어가는 것입니다. 염의 존재가 섞임성을 변화시킬 수 있다는 점을

항시 염두에 두어야 합니다. 예를 들어, 물과 isopropanol(IPA)은 순수한 상태에서는 잘 섞이지만, 높은 염 농도에서는 그렇지 않습니다.

또 다른 입자성 물질의 원천은 수용성 이동상 용기 내에서 생장하는

미생물입니다. 다중 용매 시스템에서는 일반적으로 일체형 용매 프로포셔닝 밸브를 사용해 분석 시 수용성 용매와 유기 용매 구성을 혼합합니다. 이는 분석자의 작업을 간소화해 주지만, 수용성 이동상 용기와 라인 내부에 미생물이 생장하는 위험을 높이기도 합니다. 완충액을 포함한 용액은 더욱 미생물 친화적인 환경이 될 수 있습니다. 미생물 입자를 항상 볼 수 있는 것은 아닙니다. 그것은 컬럼의 인렛 프리트(inlet frit)에 모일 수 있어, 높은 역압과 고스트 피크를 야기합니다. 또한 미생물의 크기가 종종 컬럼 인렛 프리트의 공극 크기보다 작아, 공극을 통과하여 컬럼 베드에 모이기도 합니다. 마찬가지로, 인라인 필터가 도움이 될 수 있으나, 일단 미생물이 생장하기 시작하면 LC 시스템 전반에서 퍼질 수 있고, 그 후에는 제거하기가 매우 어렵습니다. 미생물 입자에 대한 이 골치 아픈 문제 해결 과정을 피하려면, 그들이 시스템 내로 유입되는 것을 미연에 방지하는 조치를 취하는 것이 최선입니다. 수용성 이동상에 소량의 유기 이동상을 첨가하면(그리고 분석법 조건을 약간 조정하여 보정) 미생물의 생장을 방지할

**"이동상 내의 작은 입자는
탈기장치 고장, 펌프 씰(seal)
또는 피스톤 손상 등 LC 구성
요소에 심각한 문제를 일으킬
수 있습니다."**



수 있습니다. 갈색 용기를 사용해 이동상을 빛으로부터 보호하면 시아노박테리아의 성장을 억제할 수 있습니다. 이 모든 조치를 거쳤더라도, 이들에 한번씩은 깨끗한 용기에 담긴 깨끗한 물로 모든 수용성 이동상을 교체해주는 것이 좋습니다. 시스템을 장시간 사용하지 않을 때에는 역상 분석법에서 사용하는 유기 용매로 물 라인을 플러싱 해 줍니다. 탈기장치는 증류수가 남아 있을 때 미생물이 발생하기 쉬운 또다른 부분입니다. 항상 모든 라인을 100% 수용성 용매 내에 보관하지 말고, 사용하지 않을 때에는 유기 용매 내에 보관하는 것이 바람직합니다.

용매 증발은 안전에 대한 우려와 더불어 사전에 혼합한 이동상의 조성을 변화시킬 수 있습니다. 올바르게 밀봉된 용매 용기는 이를 피할 수 있으나, 진공을 형성하는 것을 방지하기 위해 용기가 완전히 밀봉되어서도 안됩니다. 이를 해결하기 위해서는 간단히 라인이 통과할 만큼의 크기로 구멍을 뚫은 캡을 사용하거나, 애질런트의 InfinityLab Stay Safe Cap과 같이 일체형 필터 및 배출 시스템을 갖춘 상용캡을 사용할 수 있습니다.

LC를 사용하지 않거나, 보관이나 문제해결 등을 위해 일부 또는 시스템 전체를 플러싱 해야하는 경우가 있습니다. 시스템 내에 염이 존재하는 경우에는, 물을 이용하여 염을 용해하고 시스템에서 제거하는 것이 최우선적인 방법입니다. 일단 염의 존재를 배제할 수 있으면, IPA가 시스템을 최종 플러싱 하는 데 효과적입니다. 왜냐하면, 가장 일반적인 손상 및 역상 LC 용매와 잘 섞이기 때문입니다. IPA가 가진 상대적으로 높은 점도와 낮은 표면 장력은 기포 제거에 우수한 효과를 발휘합니다. IPA는 낮은 증기압을 가지고 있는데, 이것은

성분이 빠르게 건조되지 않는다는 것을 의미합니다. 또한 IPA는 미생물의 성장을 억제합니다.

펌프

LC 시스템에서 발생하는 많은 문제는 펌프를 통해 그 원인을 찾을 수 있습니다. 실제로 펌프는 수백 bar의 압력에서 지속적이고 안정적인 유속을 제공하도록 만들어져 있기 때문에, 펌프가 생성하는 압력은 일정해야 하므로 시스템의 압력을 모니터링하는 것은 중요한 진단 도구를 제공합니다. 역압이 꾸준히 상승하는 현상은 모듈 구성 요소가 보통 LC 시스템에 유입된 입자성 물질에 의해 오염되고 있음을 종종 나타냅니다. 입자성 물질은 또한 잦은 탈기장치의 고장 또는 예상보다 빠른 컬럼의 영구 손상을 야기할 수 있습니다. 앞서 언급했듯이 이동상이 가장 일반적인 원인이지만, 일단 압력이 상승하기 시작하면 이물질을 제거하는 것이 또 다른 최우선 해결 대상이 됩니다.

역압 상승의 원인을 추적할 때에는 검출기, 즉 다운스트림에서부터 시작합니다. 보통 시스템 역압 형성에 가장 큰 기여를 하는 것은 컬럼이므로 컬럼이 근본 원인인지, 아니면 시스템 내의 다른 부분이 문제인지를 구별해내는 것은 늘 까다로운 작업입니다. 따라서 문제를 해결하려면 언제나 컬럼을 먼저 제거하고 "restriction capillary"로 교체해야 합니다(예: Agilent p/n 5022-2159 Stainless Steel Capillary, 0.12mm ID, 2000mm length). 이 캐필러리는 신뢰할 수 있는 문제해결을 위해 약간의 역압을 제공합니다. 항상 각 시스템마다 정상적인 역압 범위를 파악하고 있는 것이



좋습니다. 탈기장치를 향해 업스트림으로 이동하면서 역압이 떨어질 때까지 구성 요소와 튜빙의 연결을 제거해 봅니다. 튜빙 연결을 제거했을 때 압력을 정상 수준으로 돌아가게 하는 부분이 바로 범인입니다.

일련의 분석을 실행하는 동안 작은 리플(ripple, 맥동)은 정상이라 할지라도(때때로 "delta"), 시스템 압력은 급격하게 변화하지 않아야 합니다. Agilent InfinityLab LC 시리즈와 같은 고급의 최신 LC 시스템에서는 분석자가 펌프의 리플을 모니터링할 수 있습니다. 시스템 간 및 분석법 간의 리플은 서로 다르지만, 급격한 변화 혹은 예상 수치 대비 큰 편차는 펌프에 문제가 있다는 것을 가리키는 강한 신호입니다. 가장 좋은 방법은, LC 시스템의 예상 압력값을 숙지하고 기록하여 모든 편차를 신속하게 식별할 수 있도록 하는 것입니다.

압력의 변화가 간혹 눈에 띄지 않을 수도 있습니다. 그렇지만 결국, 최신 LC 펌프는 대부분의 경우 신뢰할 수 있고 안정적이며, 이제는 한 번 설정하고 나면 원격으로도 운용할 수 있습니다. 때로는 다른 신호가 펌프 문제의 첫 번째 징후일 수 있습니다. 검출기 베이스라인에 노이즈가 많이 발생하거나 머무름 시간이 눈에 띄게 이동하기 시작하면, 펌프를 점검해야 합니다.

펌프 문제는 대부분 가장 일반적인 3가지 원인, 즉 펌프 내 기포, 펌프 씰(seal), 펌프 밸브 중의 하나로 귀결될 수 있습니다. 기포 문제는 보통 유기 용매를 이용하여 퍼지

"펌프 문제는 대부분 가장 일반적인 3가지 원인, 즉 펌프 내 기포, 펌프 씰(seal), 펌프 밸브 중의 하나로 귀결될 수 있습니다."

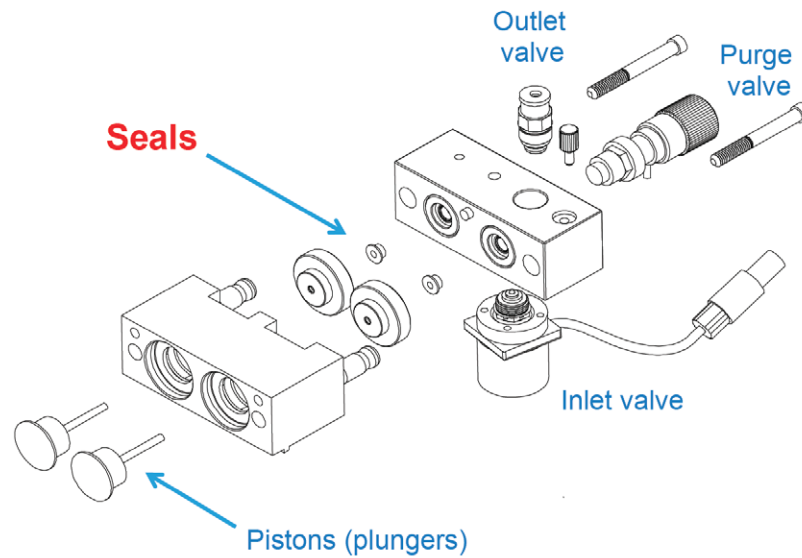
(purging)하면 해결할 수 있습니다. 시스템을 플러싱하여 기포를 제거하는 경우에는 약간의 역압을 생성하기 위해 restriction capillary를 설치하고, IPA(높은 점도를 가졌기 때문에)를 사용하는 것이 가장 좋습니다. 물론 컬럼은 미리 제거해야 합니다. 최신 LC 펌프는 특수한 기기 설정(피스톤 스트로크)을 제공하거나, 자동 플러싱 또는 자동 퍼지 절차를 사용할 수 있는 경우도 있습니다. 용매를 IPA로/로부터 사용/교체 시에는 시스템 한계 압력을 초과하지 않도록 주의해야 합니다. 멀티 라인

시스템에서는 모든 라인을 동시에 플러싱해야 합니다. 이러한 조치를 통해 문제를 해결할 수 있습니다.

기포가 제거된 후에도 시스템 문제가 계속된다면 씰(seal) 또는 밸브가 마모되었거나 손상되었는지를 점검해볼 수 있습니다. 오염된 씰(seal) 또는 고장난 밸브는 종종 베이스라인에 영향을 미칠 정도의 비정상적인 압력 리플 또는 예상보다 높거나 낮은 시스템 압력 및 머무름 시간의 이동 등으로 나타납니다. 염 완충액, 극도로 강한 용매, 극단적인 pH 등은 씰(seal)에 가혹한 조건이기 때문에, 씰(seal)을 보다 자주 교체해야 할 수 있습니다. 씰(seal) 또는 밸브를 교체하는 것은 일부 분해 과정이 필요하지만, 대부분의 시스템에서 비교적 신속하게 처리할 수 있는 작업입니다. 다수의 제조업체에서는 모든 교체 구성 요소와 상세한 설명을 포함한 펌프 헤드 유지보수 키트를 제공합니다. 해당 기기 또는 펌프 모듈용으로 지정된 올바른 소모품을



그림 1: 전통적인 펌프 헤드



5063-6589, PTFE (reversed-phase)



0905-1420, Polyethylene (normal phase)

0905-1719, universal for 1290 systems

Tool kit
5064-8211

사용하는 것이 매우 중요합니다. 빠른 참조 가이드(Quick Reference Guide)를 통해 특정 모듈에 어떤 부품을 사용해야 하는지를 빠르게 확인할 수 있습니다.

그림 1은 전통적인 Agilent HPLC 시스템 펌프 헤드의 다이어그램입니다. 씰(seal)은 빨간색으로 나타나 있습니다. 문제가 발생할 때까지 기다리는 것보다는 정기적인 교체 일정을 수립하는 것이 좋으며, 특히 기기 사용량이 많고 시스템 가동 중단시간을

최소화해야 하는 QA/QC 환경에서는 더욱 그렇습니다. 씰(seal)은 다양한 재료로 만들어집니다. 반드시 사용하는 용매와 호환되는 재료의 씰(seal)을 선택해야 합니다.

퍼지 밸브는 펌프를 플러싱하고 프라임링(priming)하는 데 매우 유용한 도구입니다. Agilent 1200 시리즈 LC 시스템은 PTFE 프리팅을 포함한 퍼지 밸브를 갖추고 있어 입자성 물질로부터 시스템의 나머지 부분을 보호하며, 이는 LC 투자를 보호하는 우수한



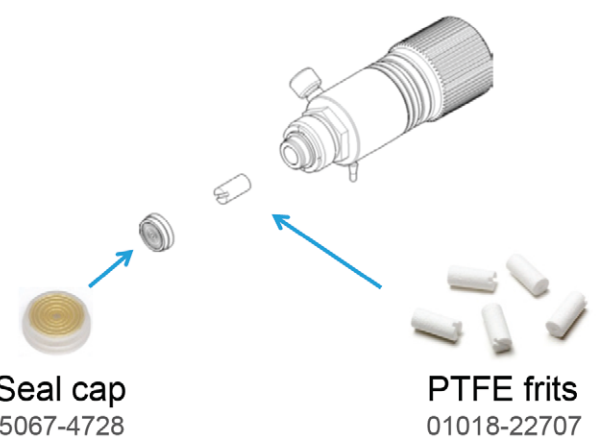
그림 2: 퍼지 밸브 내의 PTFE 프리트 교체



- Dirty frit is a source of high pressure
- Pressure drop of >10 bar across the frit (5 mL/min water with purge valve open) could indicate a blockage
- Change after changing pump seals



14 mm wrench



Seal cap
5067-4728

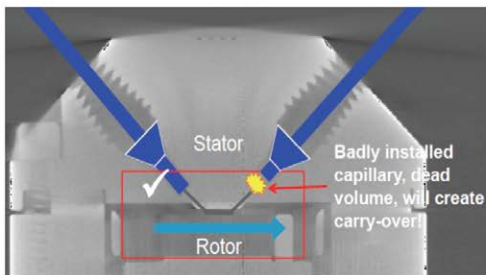
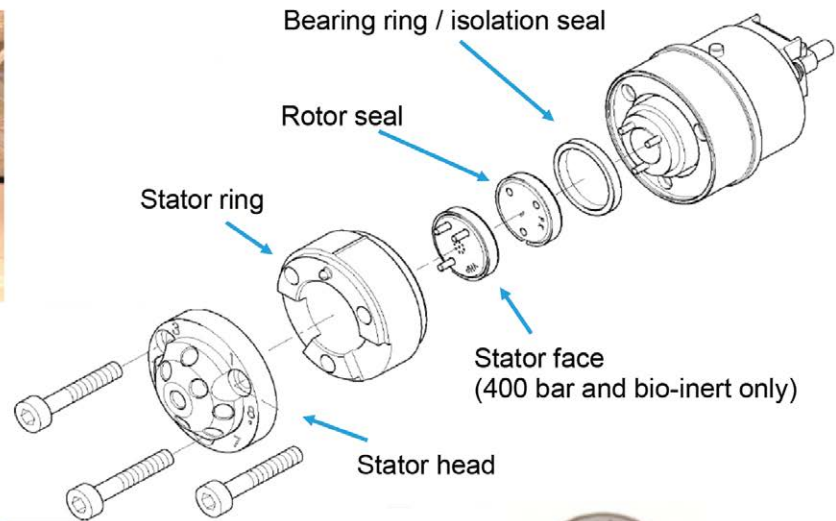
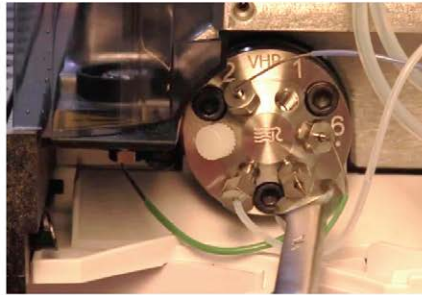
PTFE frits
01018-22707

기능입니다. 그러나 이 PTFE 프리트는 시간이 지나면서 점차 막힐 수 있습니다. 시스템 퍼지 시, 대부분의 압력 저하는 이 프리트를 통과하며 일어납니다. 물의 유속이 5mL/분일 때, 압력이 10bar를 초과하면, 프리트를 교체해야 할 시기가 온 것입니다. 프리트는 쉽게 접근할 수 있으며 빠르게 교체할 수 있습니다(그림 2 참조). 펌프 씰(seal)과 마찬가지로, 문제가 발생하기 전에 프리트를 정기적으로 교체하는 것이 보다 현명한 방법입니다.

앞서 언급했듯이 머무름 시간의 이동은 펌프 문제로 인해 발생할 수 있으나, 펌프가 정상적으로 작동하고 있다면(그리고 현재의 펌프 설정과 현재의 용매 유형이 일치한다면) 문제는 프로포셔닝 밸브에 있을 수 있습니다. 그레디언트 밸브 또는 용매 선택 밸브로도

불리는 프로포셔닝 밸브는 시간이 지남에 따라 언젠가는 고장이 나고, 교체가 필요할 수 있습니다. 탈기장치와 마찬가지로, 완충액 염을 포함한 이동상을 사용한 후에 물로 플러시하면 밸브의 수명을 연장시킬 수 있습니다. 용매 선택 밸브가 문제의 원인인지를 확인하는 방법 중 하나는 등용매 분석법에서 사용한 이동상을 사전 혼합하여 밸브를 우회하고 펌프 헤드에 직접 연결해 보는 것입니다. 표준물질 분리를 확인하기 위해 한 번에 하나의 라인 또는 펌프 헤드만을 사용해야 합니다. 그 후, 해당 용매를 하나의 용매 라인 또는 펌프 헤드에서 다른 용매 라인 또는 펌프 헤드로 옮기는 것이 문제를 따로 분리해 낼 수 있는 좋은 방법입니다.

그림 3: 주입 밸브



- Exchange rotor seal when injection reproducibility indicates wear
- Rotor seal wear is often a cause of sample carry-over

자동 시료 주입기 및 주입기

자동 시료 주입기와 주입기는 크로마토그래피 문제의 원인이 될 수 있는 복잡한 부품 구성의 장비입니다. 니들과 니들 시트(needle seat) 간의 불량한 맞물림은 캐리오버를 일으키고, 고스트 피크 또는 재현성이 부족한 정량 결과를 나타낼 수 있습니다. 니들 시트와 니들은 하나의 "기능적" 부품으로 간주해야 하며, 문제가 발생했을 경우 언제나, 반드시, 동시에 교체해야 합니다. 손상된 니들은 니들 시트를 손상시킬 수 있으며, 이 때 니들 시트만 교체하게 되면

손상된 니들은 새 니들 시트를 즉시 손상시킬 수 있고 반대의 경우도 마찬가지입니다. 니들과 니들 시트가 막힌 경우, 이 현상의 근본 원인을 확인하는 것이 매우 중요합니다. 업스트림의 일부 다른 부품(예: 바이알 캡 또는 플레이트 씰(seal))에서 부스러기를 방출할 가능성이 있습니다.

스폰서 콘텐츠



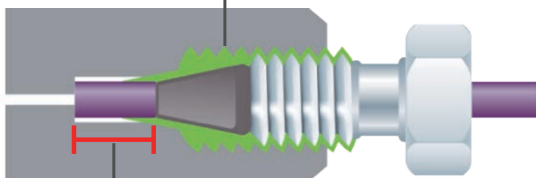
Agilent InfinityLab: 완벽한 연결

적은 스트레스,
향상된 신뢰성의 피팅

그림 4: 올바른 피팅 연결과 잘못된 피팅 연결

불량

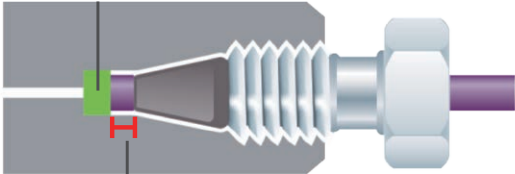
페룰이 올바르게 맞물리지 않았음 → 누출



지나치게 긴 길이

不良

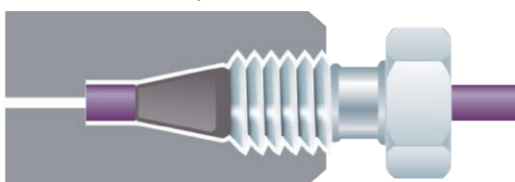
혼합 챔버 → dead volume



지나치게 짧은 길이

우수함

적절히 장착된 튜브, dead volume 없음



피팅 연결 불량 시

- 피크 넓어짐 또는 갈라짐 현상 또는 테일링 야기
- 일반적으로 모든 피크에 영향(특히, 초기 용리 피크에 큰 영향)
- 캐리오버 발생

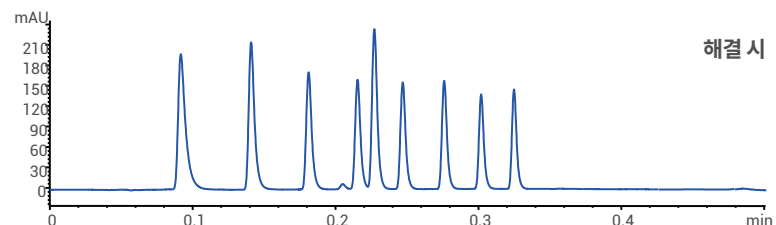
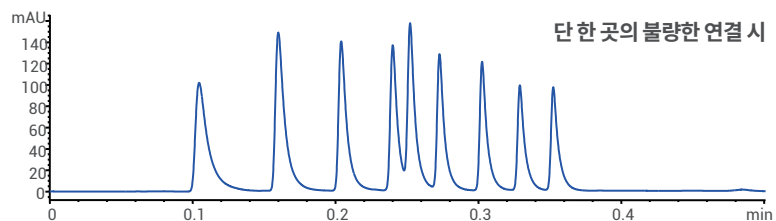


그림 3은 주입 밸브의 분해 단면도를 보여줍니다. 로터 씰(seal)은 시간이 지남에 따라 마모되거나 입자성 물질에 의해 손상됩니다. 마모된 로터 씰(seal)은 시료 캐리오버와 재현성이 불량한 주입을 야기할 수 있어 교체해야 합니다. 로터 씰(seal)은 다양한 재질로 만들어집니다. 분석자는 용매 및/또는 pH를 고려하여 적합한 재질을 선택해야 합니다. 기기 제조업체에서는 일반적으로 단일 패키지 내에 자동 시료 주입기 모듈의 모든 소모품을 포함한 키트를 제공합니다.

컬럼

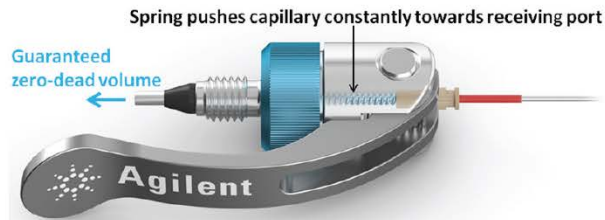
적합하지 않은 컬럼 선택이나 틱새 부피를 발생시키는 노후화된 컬럼은 컬럼 효율을

저하시키는 요인이 될 수 있습니다. 그러나 낮은 컬럼 효율은 캐필러리 튜빙의 크기가 올바르지 않은 경우에도 발생할 수 있습니다. 시스템에 적합한 가장 작은 직경과 가장 짧은 튜빙을 사용해야 합니다. 길이가 너무 길거나 내경(ID)이 지나치게 큰 캐필러리 튜빙은 컬럼 외 부피(extra-column volume)를 증가시켜, 피크가 컬럼에 도달하기 전에 피크의 (폭)넓어짐에 영향을 미칠 수 있습니다.

피팅(fitting)의 유형은 제조업체별로 다를 수 있습니다. 잘못된 피팅을 사용하면 기기 손상 또는 누출이나 테일링 피크 현상을 일으킬 수 있습니다. 가장 일반적인 제품은 10-32 나사산(thread)과 1개 이상의 테이퍼드 페룰(tapered ferrule)을 포함한 Swagelok형입니다. 피팅을

그림 5: Agilent InfinityLab Quick Connect 및 Quick Turn Fitting

- Spring loaded design
- Easy! No tools needed
- Works for all column types
- Reusable
- Consistent ZDV connection

**Quick Connect Fitting**

- Finger tight up to 1300 bar
- Hand tighten the nut, then depress the lever

**Quick Turn Fitting**

- Finger tight up to 400 bar
- Up to 1300 bar with a wrench
- Compact design



처음으로 설치할 때는 피팅을 조이기 전에 튜빙을 끝까지 밀어넣어야 합니다. 그렇지 않으면 틈이 발생하여 피크 넓어짐 현상을 일으키며, 이는 보통 일관된 피크 테일링 현상으로 나타나고, 보다 적게 머무르는 피크에서도 마찬가지입니다. **그림 4**는 피팅의 올바른 설치와 잘못된 설치의 예를 보여줍니다. 그러나 보다 새로운 컬럼 연결 기술을 통해

이와 같은 문제에서 벗어날 수 있습니다. 예를 들어, Agilent InfinityLab Quick Connect Fitting은 컬럼의 유입 포트 깊이에 자동으로 맞추는 스프링 로드 기능으로 이와 같은 문제를 해결합니다(**그림 5** 참조).

문제 발생 시, 컬럼 연결 피팅을 점검하는 것도 매우 중요합니다. 왜냐하면, 손상된 피팅이 새로운 컬럼의 유입 포트 또한 손상시킬 수 있기 때문입니다. 표준 스테인리스강 피팅을 사용하는 경우에는 새로운 컬럼으로 교체할 때 새로운 캐필러리를 사용해야 합니다. 왜냐하면 새 컬럼이 약간 다른 스웨이징 깊이(swage depth, 피팅과 맞물리는 부위)를 가지고 있거나, 오래된 캐필러리의

스폰서 콘텐츠

Agilent InfinityLab Stay Safe Cap – 용매 증발 감소





마모된 피팅이 새로운 컬럼 피팅을 손상시킬 수 있기 때문입니다. 뿐만 아니라, 컬럼 연결 피팅을 과도하게 조이지 않도록 주의해야 합니다(일반적으로 표준 스테인리스강 피팅의 경우). 과도하게 힘을 주면 피팅 및 컬럼의 유입 포트를 손상시켜 용매 누출이 발생할 수 있습니다. 이렇게 되면 사용자는 누출을 막기 위해 해당 연결 부위에 더욱 많은 힘을 가하여 조이려고 할 수 있습니다. 결국에는 지속적인 누출 현상 또는 단순히 컬럼의 수명이 다했기 때문에 컬럼을 교체해야 할 것입니다.

다시 한번, Agilent InfinityLab Quick Connect Fitting과 같은 새로운 탈착식 피팅은 다양한 포트 깊이에 자동으로 최적화하는 스프링 로드 기능과 손상된 경우 폐물을 교체할 수 있는 기능으로 이와 같은 문제를 해결할 수 있습니다.

컬럼 자체에서도 다양한 문제가 발생할 수 있습니다. 그 중 하나는 이미 언급했던 바와 같이, 세심하지 못한 관리나 노후화로 인해 컬럼에 틈새 부피가 발생하는 것입니다. 틈새 부피 상에서 또는 그 가까이에서 용리되는 피크에서 폭 넓어짐 또는 테일링이 나타나고, 컬럼 외 (띠) 넓어짐 현상이 배제된 경우라면 컬럼을 교체해야 할 때가 되었을 수 있습니다. 시스템 문제로 인한 것이 아닌 높은 역압은 컬럼을 지나치게 많이 사용했거나 제제 부형제와 같은 불용성 성분이 컬럼에 주입되어왔을 경우, 컬럼 오염으로 인해 발생할 수 있습니다. 또한 미생물 오염도 컬럼 베드에 축적될 수 있습니다. 이상의 모든 경우에, 컬럼을 새 것으로 교체해야 할 수 있습니다. 시스템에 일상적 예방 점검을 수행하고, 시료 필터링 또는

고체상 추출과 같은 시료 전처리 기술의 추가를 통해 이와 같이 비용이 많이 드는 문제해결 및 LC 시스템의 가동 중단 시간을 줄일 수 있습니다.

검출기

UV 검출기에서는 2가지 구성 요소, 즉 램프와 플로우 셀 부분만 주의하면 됩니다. 대부분의 램프는 중수소 가스를 함유하고 있으며, 이 가스는 시간이 지남에 따라 누출됩니다. 분석법의 감응이 피크 비율에 기반하기 때문에, 처음에는 전구가 약화되는 것이 눈에 띄게 보이지 않을 수 있지만 시간이 지남에 따라 베이스라인 노이즈가 피크 대비 점차 강하게 나타나게 됩니다. 약한 검출 신호 또는 노이즈가 많은 베이스라인은 램프 교체가 필요함을 나타내는 중요한 징후입니다. 램프 교체 시, 전구를 만지지 않도록 주의해야 합니다.

플로우 셀은 일반적으로 유지보수가 필요 없지만, 문제는 발생할 수 있습니다. 다운스트림에서 두 번째 검출기를 사용한다면, 이것으로 인해 발생하는 추가적인 역압을 인지하고 있어야 합니다. 첫 번째 플로우 셀에 과도한 역압이 걸리면 플로우 셀이 파열될 수 있습니다. 이와 같은 응용에서는 고압 셀을 사용할 수 있습니다. 셀은 또한 더러워질 수 있으며 깨끗하게 플러시해야 합니다.



스폰서 콘텐츠

시료 전처리 백서
LC 시스템을 최대한 활용하세요. 여러분의 "충분히 좋은" 시료 전처리는 정말 충분히 좋습니까?



RFID 태그를 이용한 최신기술(Agilent InfinityLab 플로우 셀 및 램프와 같은)은 사용 시간을 추적하고 예방 차원의 교체를 사전 계획함으로써 시스템을 최대의 가동시간으로 유지하고 실험실의 운영 효율성을 향상시킬 수 있습니다.

결론

LC 시스템을 사용하는 동안 여러 가지 일반적인 문제가 발생할 수 있지만, 우수한 유지보수와 예방적 조치를 통해 시스템을 수 년간 큰 문제 없이 운용할 수 있습니다. 미생물 성장을 방지하고, 밸브와 씰(seal) 및 프린트를 주기적으로 교체하며, 컬럼을 올바르게 연결하고, 우수한 이동상 관리 습관을 유지한다면, 비용과 시간 낭비를 초래하며 분석자를 곤란에 빠트리는 시스템 가동 중단 시간을 피하는 데 큰 도움이 될 것입니다. 또한 일부 실험실 직원이 전문적인 문제해결 교육을 받는 것도 도움이 될 수 있습니다. 고객 교육(기초 및 문제해결 교육 과정)은 사용자들이 기기의 특수 기능 및 작동 원리를 이해하고 문제해결, 기기 가동 중단 시간 단축 및 잠재적인 문제의 사전 감지 등에 대한 방법을 익히는데 도움을 주어, 기기의 올바른 작동을 보장합니다.



Mia Summers
전 LC 컬럼 제품 매니저
애질런트 테크놀로지스



Andreas Kugler
LC 소모품 제품 지원
엔지니어
애질런트 테크놀로지스



스폰서 콘텐츠



분석 향상을 위한 LC 컬럼 특성 제대로 활용하기

Anne Mack

크로마토그래퍼(chromatographer)는 액체 크로마토그래피(LC) 분석법 개발 과정에서 많은 의사결정을 하게 되며, 이러한 의사결정은 견고한 분석법 개발에 있어 매우 중요합니다. 컬럼 선택은 이러한 의사결정 중의 하나이며, 성공적인 분석에 커다란 영향을 미치는 요소입니다. 본 내용에서는 다양한 컬럼 특징을 살펴보고, 적절한 LC 컬럼 선택을 통해 크로마토그래피 결과를 개선할 수 있는 방법을 소개합니다. 이는 다양한 선택성을 통한 피크 모양 및 분리능 향상, 이동상 조성과 pH에 대한 영향 및 컬럼 수명 연장 관련 내용을 포함합니다.

분석법 개발에서의 문제 및 목적 정의

오늘날, 몇 가지 문제들이 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 분석법 개발을 그 어느 때보다도 혼란스럽게 만들 수 있습니다. 주요 문제 중 하나는 사용할 크로마토그래피 모드 및 적절한 HPLC 컬럼을 선택하는

것입니다. 크로마토그래퍼들이 선택할 수 있는 크로마토그래피 모드가 매우 다양하기 때문에, 그 중 어떤 것을 사용할지를 선택하는 것이 어려울 수 있습니다. 그러나 모든 HPLC 분리의 약 80%가 역상 모드를 이용해 수행되므로, 엔드캡핑이 우수한 C18 고정상으로 시작하는 것이 바람직합니다. 또 다른 문제는 분석법 이전(method transfer)입니다. 많은 기업들이 전 세계에 실험실을 보유하고 있으며, 그 실험실 간에 분석법을 이전하여 이전을 받은 실험실에서도 반드시 원래 (이전해준) 실험실과 동일하게 분석법을 수행할 수 있어야 합니다. 또한, 제약 업계에 많이 존재하는 위탁계약 연구기관에서는 다양한 브랜드의 HPLC 기기를 보유하고 있을 수 있습니다. 이렇게 서로 다른 제조업체의 기기는 시스템 부피, 튜빙과 피팅 및 기타 운영 특성에서 광범위한 차이를 보이기 때문에, 이러한 다양성이 분석법 이전 과정을 복잡하게 만듭니다. 따라서 분석법 개발 과정을 간소화할 수 있는 방법이 필요합니다.

실제 분석법 개발 과정을 시작하기 전에, 먼저 분리 목적을 수립해야 합니다. 이때 고려해야



그림 1: 일반적인 분리 목표 및 성능 기준

Good System Suitability Parameters

- Resolution: ≥ 2
- Peak shape: USP T_f close to 1 (< 2)
- Injection Repeatability: areas, T_f , etc. (RSD 0.1 - 0.25%)
- Absolute retention factors: $1 < k < 10$
- Relative Retention: α or k_2/k_1
- Signal-to-Noise Ratio: > 10

Method Performance Criteria

- Accuracy
- Precision
 - Ruggedness
 - Robustness
- Selectivity/Specificity
- Linearity
- Range
- Quantitation Limit (LOQ, $10 \times S/N$)
- Detection Limit (LOD, $3 \times S/N$)

AVOID THESE for System Suitability Criteria:

*Column efficiency (theoretical plates)
& Absolute retention time*

These inhibit the ability to speed up your method in the future!

할 사항은 다음과 같습니다.

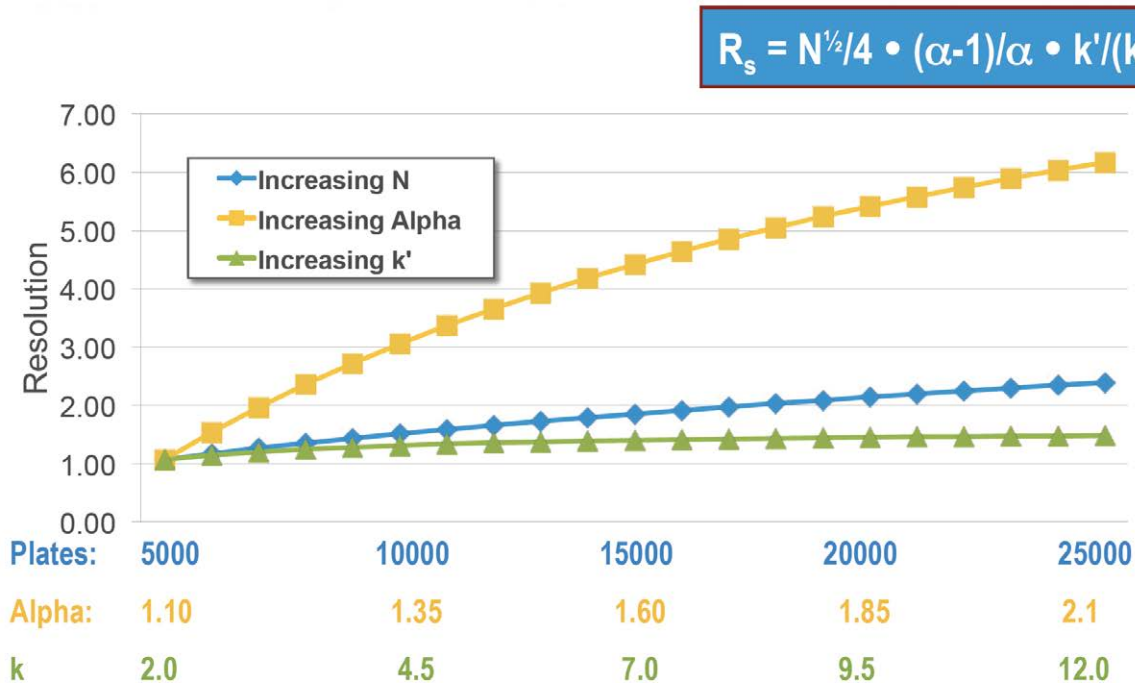
- 몇 개의 피크가 나타날 수 있는가?
- 피크간의 분리가 쉬운가? 아니면 까다로운가?
- 효율성과 속도(분석 시간 또는 주입 간 주기 시간)가 중요한가?
- 어떤 종류의 기기를 사용할 수 있는가?
- 이동상 그레디언트를 사용할 수 있는가?
- 400bar 이상의 압력을 사용할 수 있는가?
- 일상적인 시료를 분석할 작업자는 누구인가? 그 작업자의 숙련도는 어떠한가?

이와 같은 질문은 그 외 질문과 함께, 분석법 요건을 결정하고 개발에 어느 정도의 노력을 기울여야 하는지를 결정하는 데에 도움을 줄 수 있습니다.

분석법 목적 이외에, 응용에 따른 몇 가지 목표를 염두에 두는 것도 매우 중요합니다.

그림 1의 왼쪽에는 대부분의 응용 분석에서 공통적으로 설정하는 분석법 목표가 나타나 있으며, 이 중 대다수는 흔히 시스템 적합성 테스트 요건에 포함되어 있습니다. 분리능은 분석법 개발에서 더욱 중요한 기준 중 하나이며, 특히 자외선, 증기화 광산란 검출기 또는 형광과 같은 비특이적 검출기 사용 시에 더욱 중요합니다. 최소 2 이상의 분리능을 권장하나, 분리능이 1.5일 때, 인접한 두 피크는 베이스라인 분리된 것으로 간주합니다. 분석법 밸리데이션 과정에서 시스템 적합성 파라미터를 정립하며, 이 때 그림 1의 오른쪽에 나와 있는 분석법 성능 파라미터를 평가합니다. 시스템 적합성 파라미터와 기준을 설정할 때에는 나중에 분석법의 수정 가능성을 제한하는 기준은 피하는 것이 좋습니다.

그림 2: 분리능에 영향을 미치는 변수, 효율성, 선택성 및 머무름 인자(선택성이 가장 큰 영향을 끼침)



Selectivity Impacts Resolution Most

- Change bonded phase
 - Change mobile phase
- } Typical Analytical Method Development Parameters

Plates are easiest to increase

예를 들어, 컬럼 효율 또는 절대 머무름 시간을 시스템 적합성 기준으로 사용하게 되면, 분석법 변경 시 밸리데이션 과정 전체를 완전히 다시 수행해야 할 수도 있습니다.

분석법 개발: 어디에서부터 시작해야 하는가?

분석법 개발 목표 및 목적을 확정하고 나면, **그림 2**의 오른쪽 상단에 나타나 있는 분리능 공식을 이용해 분석법 개발을 시작합니다. 그림 2에서 볼 수 있듯이, 컬럼 효율(N), 선택성(α), 머무름 인자(k')는 분리능을 결정하는 변수입니다. 그림 2의 산점도는

이 3가지 변수가 각각 분리능에 끼치는 영향 정도를 보여줍니다. 분리능에 끼치는 영향은 컬럼 효율과 머무름 변수 대비, α 값 (또는 선택성)이 훨씬 큼니다. 따라서 분석법 개발 과정 중에 선택성을 변화시키면, 원하는 분리능을 달성하기 위해서 분리에 가장 큰 효과를 줄 수 있습니다. α 또는 선택성은 시스템 케미스트리(화학적 성질), 즉 이동상 (조성 또는 pH), 컬럼 결합상(예를 들어, C18, C8, phenyl-hexyl, 또는 cyano) 또는 두 가지 모두를 변경하여 바꿀 수 있습니다. 또한, 컬럼 온도는 특히 산 또는 염기가 존재하는 경우 α 에 영향을 끼칠 수 있습니다.



HPLC 컬럼의 물리적 특성

분석법 개발을 시작하기 전, LC 컬럼을 선택할 때 입자 공극 크기와 입자 기술 및 입자 자체의 실제 크기를 포함한 여러 물리적 특성을 반드시 고려해야 합니다.

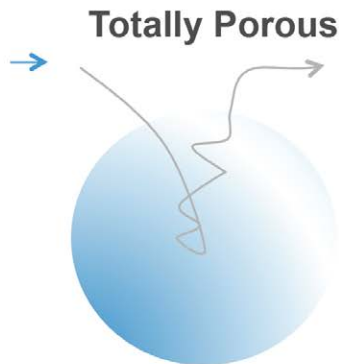
최적의 공극 크기를 선택하는 것은 모든 HPLC 분석 응용에 있어서 중요합니다. 비교적 작은 80 ~ 120Å 공극 크기의 컬럼 충전제는 보다 작은 분자(즉, 분자량 4,000 이하의 분자량) 분리에 사용됩니다. 작은 공극 크기의 컬럼은 또한 로딩 용량과 머무름을 극대화할 수 있습니다. 조금 더 큰 120Å의 공극 크기는 펩타이드 맵핑에 적합하며, 300Å의 공극 크기는 원형(intact) 펩타이드 및 단백질과 같은 큰 분자에 사용합니다. 매우 높은 분자량을 갖는 단백질의 경우에는 이보다 더 큰 1000~4000Å의 공극 크기를 사용하기도 합니다.

초기의 액체 크로마토그래피에서는, 공극 크기가 10μm보다 훨씬 컸었습니다. 1970년대 초반에 이르러서야, HPLC 전용의 작고 완전 다공성인 실리카 입자가 만들어지기 시작하였습니다. 1980년대에는, 5μm 크기의 입자가 출시되었으며, 1990년대에는 3.5μm의 입자로 보다 빠른 분리가 가능해졌습니다. 지난 10년간 대중적으로 많이 알려진 컬럼 입자 기술은 초고성능 액체 크로마토그래피(UHPLC) 응용을 위한 sub-2μm 완전 다공성 입자(totally porous particle, TPP)입니다. 그러나 sub-2μm의 입자는 이 입자의 성능을 완전히 활용할 수 있도록 특화된 장비를 필요로 합니다.

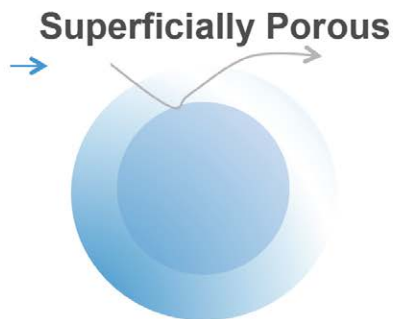
표면 다공성 입자(superficially porous, SP)는 이에 대한 새로운 대안적 기술로서, 보다 오래된 기존의 5μm 입자 충전 컬럼에 비해 컬럼 효율과 피크 용량을 크게 높이면서 이미 보유하고 있는 기존의 일반 HPLC 시스템에서 사용할 수 있는 장점을 제공합니다. 그러나 표면 다공성 입자의 사용이 모든 문제를 해결할 수 있는 마법이 아니라는 것을 유념해야 합니다. 이 입자는 5μm 입자와 동일한 크로마토그래피 원리를 따르기 때문에 동일한 분석법 개발 과정을 사용할 수 있습니다. 표면 다공성 입자의 견고한(공극없이 완전히 막힌) 핵은 외부 셸(shell)까지의 확산을 줄여줍니다. **그림 3**은 이러한 입자가 더 효율적인 이유를 보여줍니다. 보다 짧은 확산 거리는 피크 넓어짐 현상을 줄이고, 보다 높은 컬럼 효율(이론단수)을 성취하는 동시에, 컬럼 효율을 유지하면서 더 높은 유속/빠른 분석을 가능하게 해줍니다.

입자 크기의 선택은 분리의 복잡성과 그에 따라 요구되는 분리능에 다소 영향을 받습니다. 일반적으로 입자 크기가 작을수록 컬럼 효율이 더 높습니다. 그러나 이러한 컬럼 효율에는 대가가 따릅니다. 왜냐하면, 압력은 컬럼 길이에 비례하고 입자 크기의 제공에 반비례하기 때문에 입자 크기가 작아질수록 시스템 역압이 상승하기 때문입니다. 표면 다공성 입자는 1.9μm, 2.7μm 및 4μm 등 3가지 다른 입자 크기로 이용 가능합니다. 입자 크기의 선택은 분리능 요구와 사용 가능한 기기에 따라 결정할 수 있습니다. 전체 직경이 압력을 결정하므로, 표면 다공성 입자는 같은 크기의 완전 다공성 입자(TPP)와 비슷한 압력에서 작동합니다.

그림 3: 입자 기술: 표면 다공성 입자는 질량 이동(mass transfer)을 개선함으로써 완전 다공성 입자 대비, 보다 높은 컬럼 효율 제공



- **Totally porous particles**
 - diffusion throughout particle
- **Poroshell 120**
 - diffusion limited to outer shell



- **Results:**
 - **Higher efficiency**
 - **Higher flow rate with minimal impact on efficiency**

다공성 층의 두께가 컬럼 효율을 결정하는데, 표면 다공성 입자(SP)를 사용하면 기존의 5 μ m TPP에서보다 최대 200% 향상된 컬럼 효율을 얻을 수 있습니다.

일반적으로 1.9 μ m의 표면 다공성 입자는 가장 높은 UHPLC 성능을 성취하기 위해 사용하고, 2.7 μ m는 보다 낮은 작동 압력에서 UHPLC 성능을 사용하고자 할 때 사용하며, 4 μ m는 HPLC 성능 향상을 위해 사용합니다. 2.7 μ m와 4 μ m 입자의 또 다른 장점은 보다 큰 전체 크기로 인해 5 μ m 입자 컬럼에서 사용하는 것과 동일한 2 μ m 프릿을 컬럼 인렛에 사용할 수 있다는 점으로, 따라서 이들 컬럼은 **그림 4**에서 희석하지 않고 새로 끓인 녹차 시료에 대한 1,600회 이상의 주입 결과에 나타난 바와

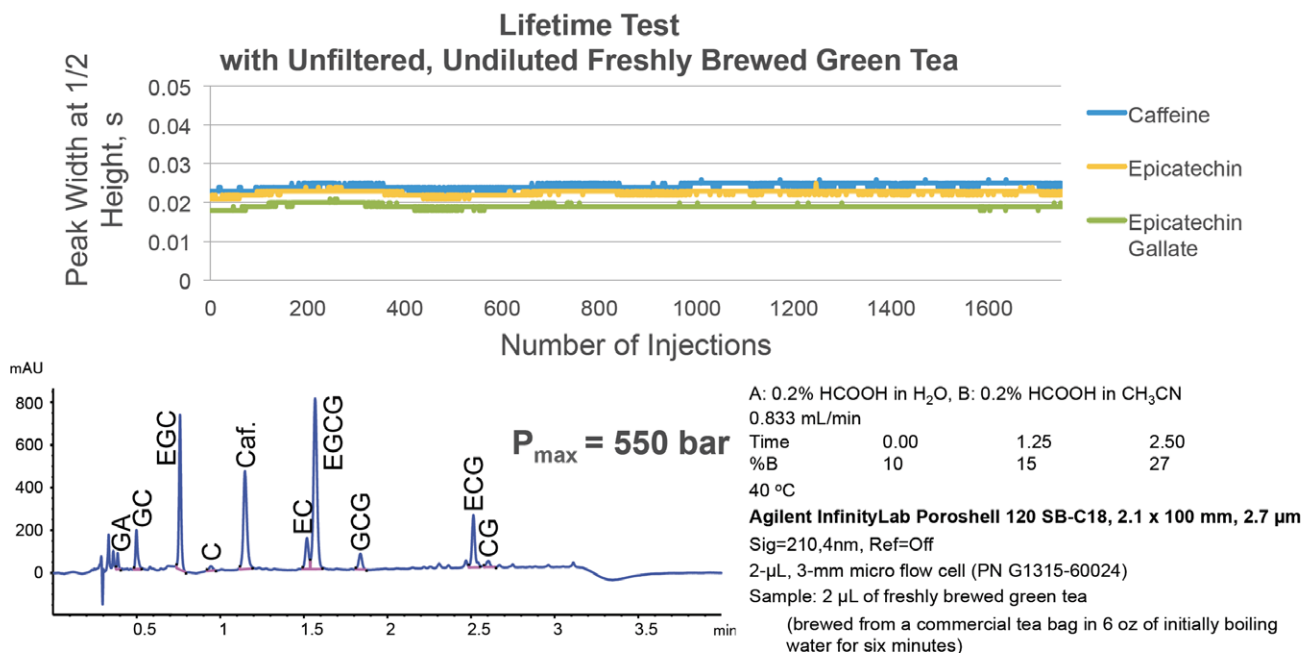
같이, sub-2 μ m 입자 컬럼에 비해 막힘 문제에 덜 민감합니다.

HPLC 컬럼 결합상 옵션

서로 다른 결합상에서는 서로 다른 화학적 상호작용이 두드러지게 나타나므로, 특정 시료에 대한 분리 조건은 적절한 결합상의 선택을 통해 세밀하게 조정할 수 있습니다. 극성과 비극성 화합물은 다양한 컬럼 케미스트리에서 서로 다른 거동을 보입니다. 분석물질 내에 pi 결합이 존재하는 경우(예를 들어, 방향족 화합물), 강한 pi-pi 상호작용을 이끌어낼 수 있는 phenyl-hexyl 결합상을 유용하게 사용할 수 있습니다. 선택성을 향상시키는 것 외에도, 결합상의 변화가 어떤 경우에는 분석 시간을 줄일 수도 있습니다.

그림 4: 더러운 시료에서도 긴 수명을 유지하는 2.7µm InfinityLab Poroshell 120 컬럼

>1800 Injections at 550 bar - No Performance Change



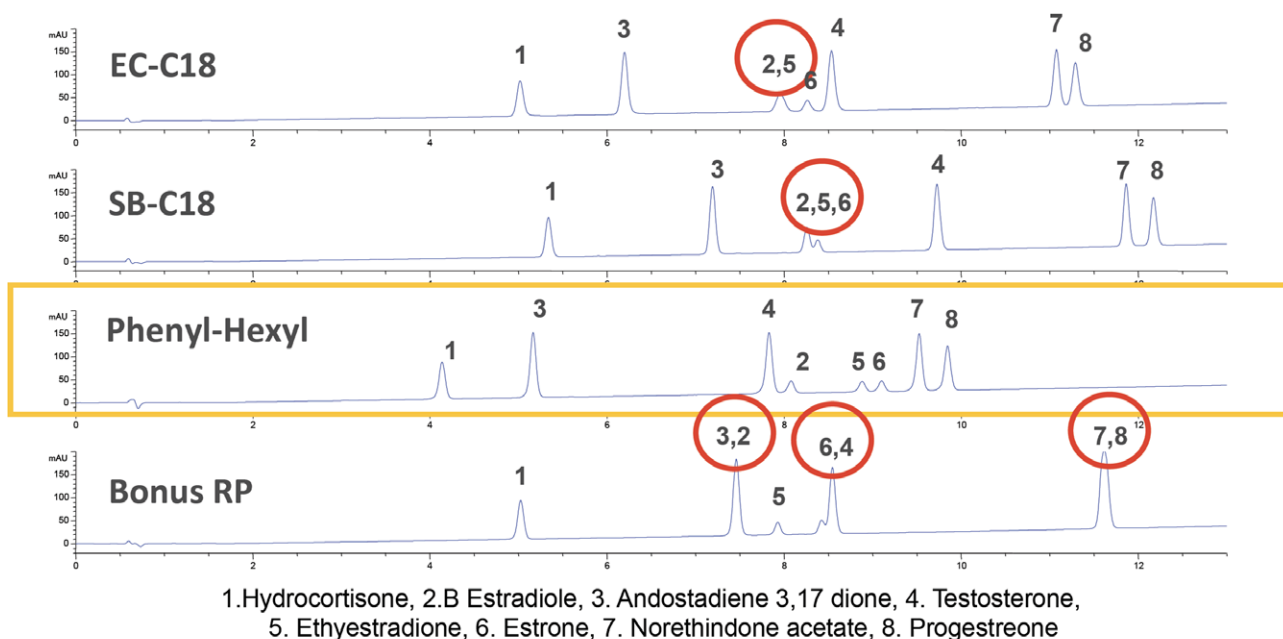
C18과 C8 결합상은 분석법 개발에서 아주 좋은 첫 번째 선택입니다. 이들 결합상은 pH 2~9 범위에서 뛰어난 성능을 발휘합니다. 실리카와 결합상의 결합 과정 중, 실리카 표면에 남아있는 Si-OH 그룹의 엔드캡핑(endcapping) 또는 비활성화 또한 선택성에 영향을 미칠 수 있습니다. 많은 C18 및 C8 결합상을 엔드캡핑 또는 비-엔드캡핑 형태로 이용 가능하며, 분석법 개발 과정 중 이 영향을 평가할 수 있습니다. Phenyl-hexyl은 분석물질과 고정상 사이의 pi-pi 상호작용을 활용할 수 있는 또 다른 우수한 대체 결합상입니다. Phenyl-hexyl 상의 선택성은 phenyl 또는 diphenyl 컬럼과 매우 유사합니다. 극성 그룹을 결합상에 포함하고 있는 형태의 기타 상들도 역시 극성

화합물에 대한 독특한 선택성을 줄 수 있는 좋은 선택입니다. Cyano 상은 순상과 역상 분리에 모두 사용 가능하며, 순수 실리카(bare silica) 상은 극성이 매우 강한 분자를 위한 소수성 상호작용 크로마토그래피(HILIC)에서 사용할 수 있습니다. 또한 pentafluorophenyl 상은 극성 화합물에 대한 직교적(대안적 선택성) 결합상으로 사용할 수 있습니다.

다양한 케미스트리의 선택성에 대해 보다 자세히 이해하기 위해, 결합상 특성 규명 테스트를 수행할 수 있습니다. 역상 케미스트리 특성 규명의 예로는 Tanaka Test 및 Hydrophobic Subtraction Model(HSM)이 있습니다. 이들 테스트는 여러 파라미터에 근거하여 케미스트리를 분류하며, 두 컬럼 간의

그림 5: Methanol 그레디언트에 의한 8종 스테로이드 분리 - 적절한 컬럼 상 선택으로 보다 쉽게 분석법 개발 가능

Best Resolution of all analytes with InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl



40-80 % Methanol/14 min, DAD 260, 80 nm 0.4 ml/min, 2.1 x 100 mm 40 C 0.1% Formic Acid in Water and Methanol, Agilent 1260 Method Development Solution.

유사 인자(similarity factor, F_s)를 계산하는 데에 사용할 수도 있습니다. 작은 F_s 는 두 컬럼이 매우 유사함을 나타내며, 반대로 큰 인자 값은 두 컬럼이 매우 다르다는 것을 의미합니다. 분석법 개발 시, 분리능 향상을 위해 서로 완전히 다르거나 직교적 선택성을 제공하는 컬럼을 평가하는 것이 유용합니다.

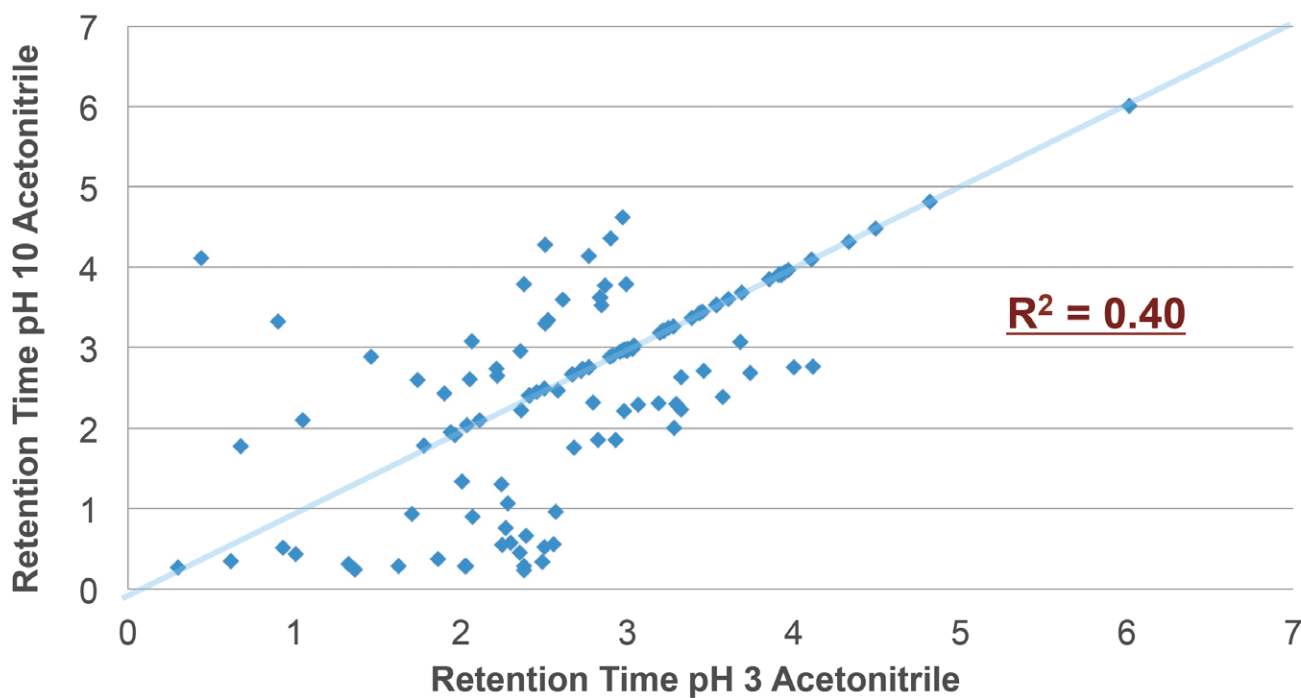
그림 5는 컬럼 선택성이 어떻게 분리능 향상에 영향을 끼치는지의 사례를 보여줍니다. 이 사례에서는 methanol 그레디언트 이동상을 사용해 8종의 스테로이드를 분리하였습니다. 많은 상에서 선택성의 변화를 관찰할 수 있습니다. 또한 상당히 괜찮은 분리 결과를 얻었지만, 일부 피크가 아예 분리되지 않은 결과도 있습니다. 그러나 phenyl-hexyl

상에서는 모든 8종 스테로이드가 베이스라인 분리되었으며, 분석 시간은 나머지 모든 상보다 빠르게 나타났습니다. 추가적인 작업이 없으면 모든 상이 시료 내의 모든 화합물을 분리할 것이라고 확신할 수 없습니다. 하지만 **그림 5**에서 입증한 바와 같이, 고정상의 변화가 선택성에 영향을 주며 이는 분석법 개발 과정 초기에 큰 도움이 됩니다.

이동상 pH에 의한 선택성 변경

이동상의 pH 또한 이온화 가능한 화합물의 머무름과 선택성에 영향을 줄 수 있습니다. 많은 새로운 상은 넓은 pH 범위(예: 2 ~ 10)에서 사용할 수 있기 때문에, 이제 pH는 머무름과 분리능을 모두 향상시켜 선택성을

그림 6: 서로 다른 이동상 pH가 매우 다른 선택성을 제공(pH 3 과 10의 여러 분석물질에서 머무름 시간에 대한 상관관계가 낮은 것을 통해 증명)



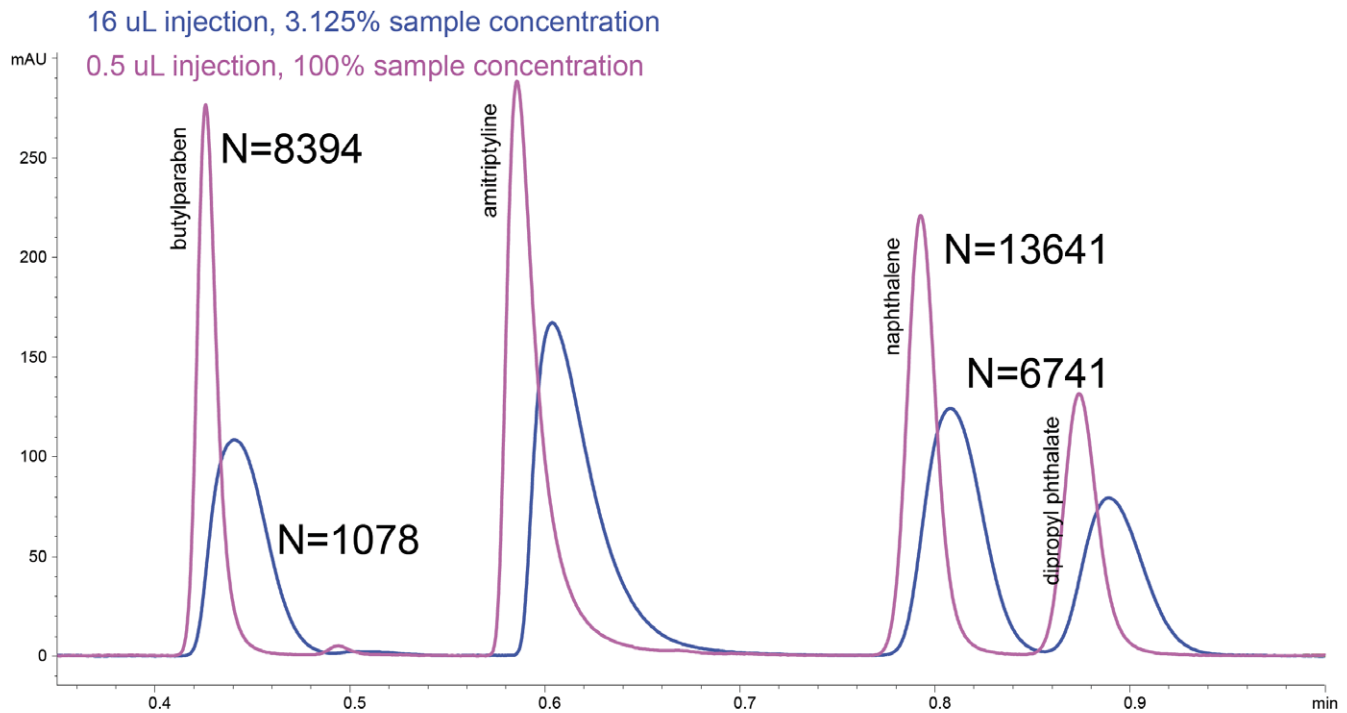
Column – Agilent InfinityLab Poroshell 120 HPH-C18 2.7 μ m.

변경하고 분석법 개발을 개선하는 데에 사용할 수 있습니다. **그림 6**은 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HPH-C18 2.7- μ m 컬럼을 이용하여 pH 3과 pH 10에서 여러 화합물의 선택성을 비교한 결과를 보여줍니다. 이 도표 내 데이터 포인트의 분산은 pH가 선택성에 미치는 영향의 정도를 나타냅니다. 여기에서 상관 계수 R^2 은 직교성의 지표로 볼 수 있으며, 0.40의 매우 낮은 값을 나타내고 있습니다. 이온화 불가능한 화합물 또는 pH 3 ~ 10의 범위에서 이온화하지 않는 화합물은 $y=x$ 에 위치한 연한 파란색 실선 상에서 용리됩니다.

퍼져있는 데이터 포인트는 pH 3~10범위에서 이온화 상태가 변화하여 그들의 머무름에 영향을 받은 화합물을 나타냅니다.



그림 7: 주입 부피는 전체 시스템 부피에 기여하기 때문에, Agilent InfinityLab Poroshell 120 1.9 μ m 컬럼과 같은 고효율 컬럼 성능을 유지하기 위해서는 낮은 부피를 유지해야 합니다



고효율 LC 컬럼의 효과 극대화

고효율 LC 컬럼의 효과를 극대화하기 위해서는 데이터 수집 속도, 주입 부피, 시스템 확산에 대한 가드 컬럼 및 피팅의 영향 등을 반드시 고려해야 합니다.

데이터 수집 속도란 검출기가 정보를 기록하는 빈도를 의미하며, 낮은 데이터 속도는 인위적으로 넓고 작은 피크를 생성하게 되어 컬럼 효율과 분리능을 저하시킬 수 있습니다. 일반적인 경험적 규칙은 크로마토그래피

피크에 걸쳐 최소 20개 이상의 데이터 포인트를 수집할 수 있도록 데이터 수집 속도를 사용하는 것입니다. 고효율 분리는 보다 좁은 피크를 생성하기 때문에, 데이터 속도를 그에 비례하여 증가시켜야 합니다. 고효율 LC 컬럼 사용 시, 일반적으로 10 ~ 20Hz 또는 그 이상의 높은 데이터 속도를 사용합니다.

스폰서 콘텐츠

Agilent LC 컬럼 Navigator
분석법 파라미터, USP 분석법
또는 화합물에 따라 귀하의
분석에 맞는 최고의 컬럼을
쉽게 찾으십시오.





주입 부피는 전체 시스템 부피에 기여하므로, 고효율 컬럼의 성능을 보존하기 위해서는 적은 부피를 유지해야 합니다. **그림 7**은 주입 부피를 감소시키는 것이 컬럼에 동일한 질량 로드를 유지하는 경우에도, 늦게 용리되는 화합물까지 포함하여 컬럼 효율을 얼마나 획기적으로 증가시키는 지를 보여줍니다.

낮은 시스템 확산은 표면 다공성 입자 컬럼의 높은 효율을 유지하기 위해 필수적이므로, 사전에 시료 전처리를 사용하는 경우에도 특히 복잡하거나 "더러운" 매트릭스를 가진 시료를 위해 특수 고안된 고압용 sub-2- μm 입자 크기의 가드 컬럼을 사용하는 것이 매우 중요합니다. 분석 컬럼을 교체하는 비용은 매우 비싸지만, 가드 컬럼은 그렇지 않습니다. 때문에 분석 컬럼의 수명 연장을 위해 가드 컬럼을 사용하는 것은 대개 좋은 방법입니다. 가드 컬럼을 선택할 때는, 분석 컬럼의 결합상과 호환 가능하고, 시스템에 추가적인 컬럼 외 부피를 더하지 않는 것으로 선택해야 합니다.

LC 컬럼 설치 시, 자주 발생하는 문제 중 하나는 컬럼을 기기에 연결해 주는 피팅과 관련이 있습니다. 컬럼과 부적절하게 맞물린 피팅은 누출, 컬럼 외 dead volume, 피크의 띠 넓어짐 및 테일링 현상으로 인한 크로마토그래피 결과 손상, 분리능 감소 등을 야기할 수 있습니다. 제조업체마다 서로 다른 스웨이지(맞물리는 부위) 깊이와 나사산(thread) 및 페룰을 사용하기 때문에, 시스템 간에 피팅을 교환해서 사용해서는 안됩니다. Agilent InfinityLab 피팅은 항상 컬럼 인렛에 올바르게 장착되도록 설계되었습니다. 이 피팅은 최대 1,300bar의 압력까지 손으로 조여 사용할 수 있기 때문에, 튜빙을 언제나 올바르게 맞물리도록 연결하고, 또한 다양한 제조업체의 기기에 모두 사용할 수 있습니다.

결론

다양한 새로운 입자 기술에서 적절한 컬럼을 선택하는 것은 분석법 개발에 있어 매우 중요한 역할을 할 수 있습니다. 선택성에 영향을 미칠 수 있는 폭넓은 종류의 결합상과, 선택성 조절 도구로서의 pH 사용을 통해—물론, 새로운 고효율 컬럼 사용의 효과를 극대화하기 위한 몇 가지 간단한 파라미터를 함께 염두해 두면서—새로운 분석법 또는 기존 분석법의 업데이트를 빠르고 효율적으로 개발할 수 있습니다.



Anne Mack

응용 분석 연구자

애질런트 테크놀로지스



당사의 전문적인 지원을 받으십시오

실험실과 함께 긴밀히 소통할 때마다 통찰력을 제공하고자 노력하는 글로벌 전문가 팀을 활용할 수 있다면 얼마나 높은 생산성을 달성할 것인지 상상해 보십시오. Agilent CrossLab을 이용하면 가능합니다.

규제 준수 서비스, 전체 실험실 이전, 성능 최적화를 위한 실험실 분석, 현장 및 주문형 교육, 애질런트 및 타사 기기를 위한 포괄적인 서비스 범위에 대해 알아보십시오. 애질런트는 또한 분석법 개발 및 최적의 컬럼과 소모품을 권장하여 귀하의 결과를 최적화합니다.

더 자세한 정보를 알아보시려면 www.agilent.com/crosslab을 방문하십시오

실험실의 실제 사례

실제 사례 44:
실험실 성능을 향상시키는

실험실 전체 데이터 분석 시스템 데이터
통찰.

이상 사례 및 더 많은 사례를 살펴보시려면
www.agilent.com/chem/story44을
방문하십시오



우수한 LC 분석법을 훨씬 향상하기

William Long

만

은 기존의 액체 크로마토그래피 (LC) 분석법은 그것이 최적의 분리 결과를 내고 있음을 확인하고, 새로운 컬럼 기술 또는 기타 수정 사항을 적용하여 결과를 향상시킬 수 있는지를 확인해보기 위해 반드시 다시 살펴봐야 합니다. 흔히 새로운 컬럼 기술의 적용과 같은 간단한 조정으로 향상된 분리능과 더 우수한 피크 모양을 얻을 수 있으며, 해당 분석법이 재현성 있게 작동하고 믿을 수 있는 (심지어 향상된) 결과를 제공할 수 있도록 할 수 있습니다. 또한 기존의 많은 분석법은 상대적으로 간단한 조정을 통해 "질량 분석 친화적"으로 만들 수 있습니다.

분리 목표 및 분석법 기준

LC 분석법을 평가하는 첫 번째 단계는 분리 목표와 분석법 성능 기준을 수립하는 것입니다. 목표 설정 시 일반적으로 고려하는 요소로는 효율성과 속도의 중요도, 시료의 복잡성, 사용 가능한 기기 및 작업자의 업무능력 등이 있습니다.

일반적인 성능 지표는 **그림 1**에 나와 있습니다. 충분한 분리능(R_s)과 재현성은 반드시 필요합니다. 머무름 인자(k')도

고려해야 합니다. 예를 들어, k' 가 너무 낮으면 용매 변경 또는 주입 부피 증가가 도움이 될 수 있지만, k' 값이 높은, 즉 늦게 용리되는 피크는 폭이 넓어져 검출하기 어려워 집니다. 신호 대 잡음비(S/N)는 일반적으로 10보다 커야 하며, 이상적으로는 100에 가까운 것이 좋습니다.

컬럼 효율(이론 단수(theoretical plate), N) 또는 절대 머무름 시간은 쉽게 변화하는 요소이기 때문에, 이것을 제한 하였을 경우 보다 빠른 분석법 개발의 실현을 방해할 수 있으므로, 이를 시스템 적합성 기준으로 정의하는 것은 피해야 합니다.

그레디언트 스카우팅

그레디언트를 스카우팅하는 것은 분석법 개발을 위한, 또는 알려진 분석법을 조정하기 위한 훌륭한 시작점입니다. LCGC의 문제해결관련 칼럼니스트인 John Dolan은 C18 컬럼과 낮은 pH를 사용한 5~95%의 유기 용매 그레디언트를 권장합니다. 그레디언트 시간은 컬럼 길이와 입자 크기에 따라 달라질 수 있습니다.¹

그레디언트 스카우팅 분석은 등용매와 그레디언트 분석법 중 어떤 것이 더 적합한지를 결정하는 데에 도움이 될 수 있습니다.



그림 1: 일반적인 분리 목표 및 성능 기준

Good System Suitability Parameters

- Resolution: ≥ 2
- Peak shape: USP T_f close to 1 (< 2)
- Injection Repeatability: areas, T_f , etc. (RSD 0.1 - 0.25%)
- Absolute retention factors: $1 < k < 10$
- Relative Retention: α or k_2/k_1
- Signal-to-Noise Ratio: > 10

Method Performance Criteria

- Accuracy
- Precision
 - Ruggedness
 - Robustness
- Analytical Selectivity/Specificity
- Linearity
- Range
- Quantitation Limit (LOQ, $10 \times S/N$)
- Detection Limit (LOD, $3 \times S/N$)

AVOID THESE for System Suit. Criteria:

*Column efficiency (theoretical plates)
Absolute retention time*

***These may prevent the ability to speed
up your method in the future!***

피크가 그레디언트 범위에 걸쳐 퍼져 있으면, 그레디언트 분석법이 바람직합니다. 피크가 모여서 유기용매 범위에서 좁게 용리된다면, 등용매 분석법으로 충분할 수 있습니다. 15분 그레디언트와 같이 빠른 그레디언트를 보다 짧고, 컬럼 효율이 높은 컬럼에서 수행할 경우에는, 추가적인 분석법(조정) 시간이 필요하거나 소모될 수 있습니다.

컬럼 및 완충액 스크리닝

컬럼과 완충액 스크리닝은 다양한 종류의 짧은 고속 컬럼과 여러 가지 이동상 완충액의 조합을 사용한 스카우팅 실험으로 수행할 수 있습니다. Sub-2 μ m Rapid Resolution High Throughput

컬럼(Agilent ZORBAX StableBond [SB]-C18, Eclipse Plus C18, Bonus-RP, Eclipse Plus Phenyl-Hexyl)과 3가지 대표적인 낮은 pH 완충액(0.1% trifluoroacetic acid [TFA], 0.1% formic acid, 0.1% acetic acid), 중간 농도 완충액으로서 ammonium acetate, 그리고 컬럼 세척을 위해 물을 사용하여, 한 그룹의 비스테로이드성 소염제 약물을 분리하는 실험을 수행하였습니다. 그레디언트 스카우팅은 SB-C18에 대해 4% MeCN 으로부터 시작하였고, Eclipse Plus C18 에 대해 8% MeCN 으로부터 시작하였으며, Bonus-RP 및 Eclipse Plus Phenyl-Hexyl에 대해 0% MeCN에서 시작하여 총 20개 조합을 사용하였습니다.



그림 2: 진통제 분리를 위한 컬럼 선택 및 완충액 스크리닝

Experiment	Rs Score	Min Rs	C_01	C_02	C_03	C_04	C_05	C_06	C_07
SB-C18 & 0.1 % TFA	1	2.456	1.051	1.242	1.454	0.793	0.954	1.352	1.529
SB-C18 & 0.1 % Formic Acid	0.979	1.437	1.05	1.243	1.457	0.79	0.957	1.348	1.5
SB-C18 & 0.1 % Acetic Acid	0.833	0.954	1.048	1.242	1.456	0.786	0.956	1.337	1.423
Eclipse Plus C18 & 0.1 % TFA	1	3.288	0.965	1.151	1.371	0.681	0.825	1.286	1.466
Eclipse Plus C18 & 0.1 % Formic Acid	1	1.921	0.962	1.149	1.37	0.677	0.825	1.279	1.422
Eclipse Plus C18 & 0.1 % Acetic Acid	1	1.623	0.958	1.146	1.368	0.673	0.823	1.261	1.325
Eclipse Plus Phenyl Hexyl & 0.1 % TFA	1	1.846	1.214	1.364	1.543	0.979	1.144	1.476	1.609
Eclipse Plus Phenyl Hexyl & 0.1 % Formic Acid	0.915	1.246	1.215	1.367	1.545	0.98	1.149	1.474	1.589
Eclipse Plus Phenyl Hexyl & pH 4.8	1	1.518	1.22	1.371	1.55	0.986	1.15	1.111	1.071
First Choice	Eclipse Plus C18 w/0.1 % TFA								
Second Choice	SB-C18 w/0.1 % TFA								
Third Choice	Eclipse Plus C18 w/0.1 % Formic Acid								
Fourth Choice	Eclipse Plus Phenyl Hexyl w/0.1% TFA								

20회 실험 중 9회에서 모든 화합물이 베이스라인 분리를 보였으나, **그림 2**에서 볼 수 있듯이, Eclipse Plus C18이 3.288로 가장 높은 최소 분리능을 분명하게 나타냈습니다. 분석 시간을 단축하기 위해 단 몇 회의 실험을 더 수행하여 추가적인 최적화를 진행할 수 있었습니다.

이동상 첨가제 선택

이동상 첨가제의 선택은 피크 모양과 위치를 변화시킬 수 있습니다. Agilent ZORBAX StableBond C18 컬럼에서 phosphoric acid,

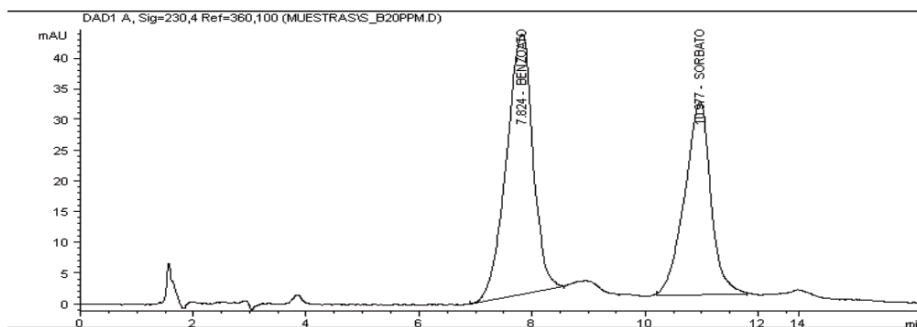
formic acid, TFA 및 acetic acid를 이동상 변형제로 사용해, salicylic acid 생산에서 발견되는 6종의 성분 분리를 수행하였습니다. Acetic acid를 사용한 StableBond에서는 동시 용리 피크가 나타났으며, 이는 formic acid를 사용한 결과와 거의 동일하였습니다. Phosphoric acid와 TFA에서는 모두 우수한 분리 결과가 나타났습니다. 분리를 보다 최적화하기 위해 TFA를 1.0%로 증가시킨 결과, 피크 테일링이 감소하였습니다.

요약하자면, 그레디언트 스카우팅 후 이동상과 pH를 간단하게 조정하면 많은 경우 향상된 분리에 빠르게 도달할 수 있습니다.

그림 3: 기존 분석법에서 Eclipse Plus 및 C18 컬럼을 이용한 nortriptyline 및 dipropyl phthalate 분석

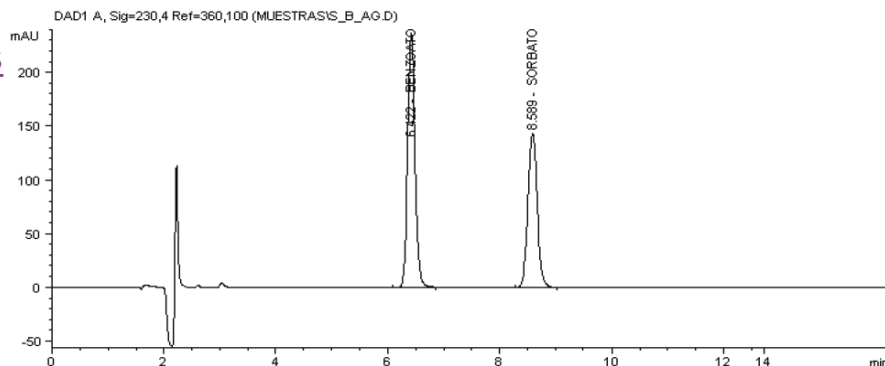
Analysis on Other C18

- Poor sensitivity
- Due to broad peaks
- Peaks do not tail, but are distorted.



Analysis on Eclipse Plus

- Better Sensitivity
- Sharp, Efficient Peaks
- Excellent peak shape



분석법 견고성

분석법은 어떤 경우에 상당히 우수할 수 있지만, 약간의 조건 변화로 인해 원치 않는 결과가 나타나기도 합니다. 이상적으로 분석법은 최소 분리능 2.0을 유지해야만 피크의 완전한 분리를 보장할 수 있습니다. 일반적으로는 작은 조정을 통해 최소 분리능을 크게 향상시켜 분석법 견고성을 개선할 수 있습니다.

InfinityLab Poroshell EC 4.6mm x 50mm, 2µm C18 컬럼에서 1.0 ~ 2.0mL/분의 유속으로 alkyl phenone류의 분리를 수행하였습니다. 예상대로 압력이 99bar에서 204bar까지 증가하였으나, 전체 분석 과정 중, 2.05라는 양호한 분리능을 유지하였습니다.

분석법 견고성을 테스트하기 위해 분리는 3개의 다른 컬럼으로 수행하였습니다. 그 중 1개

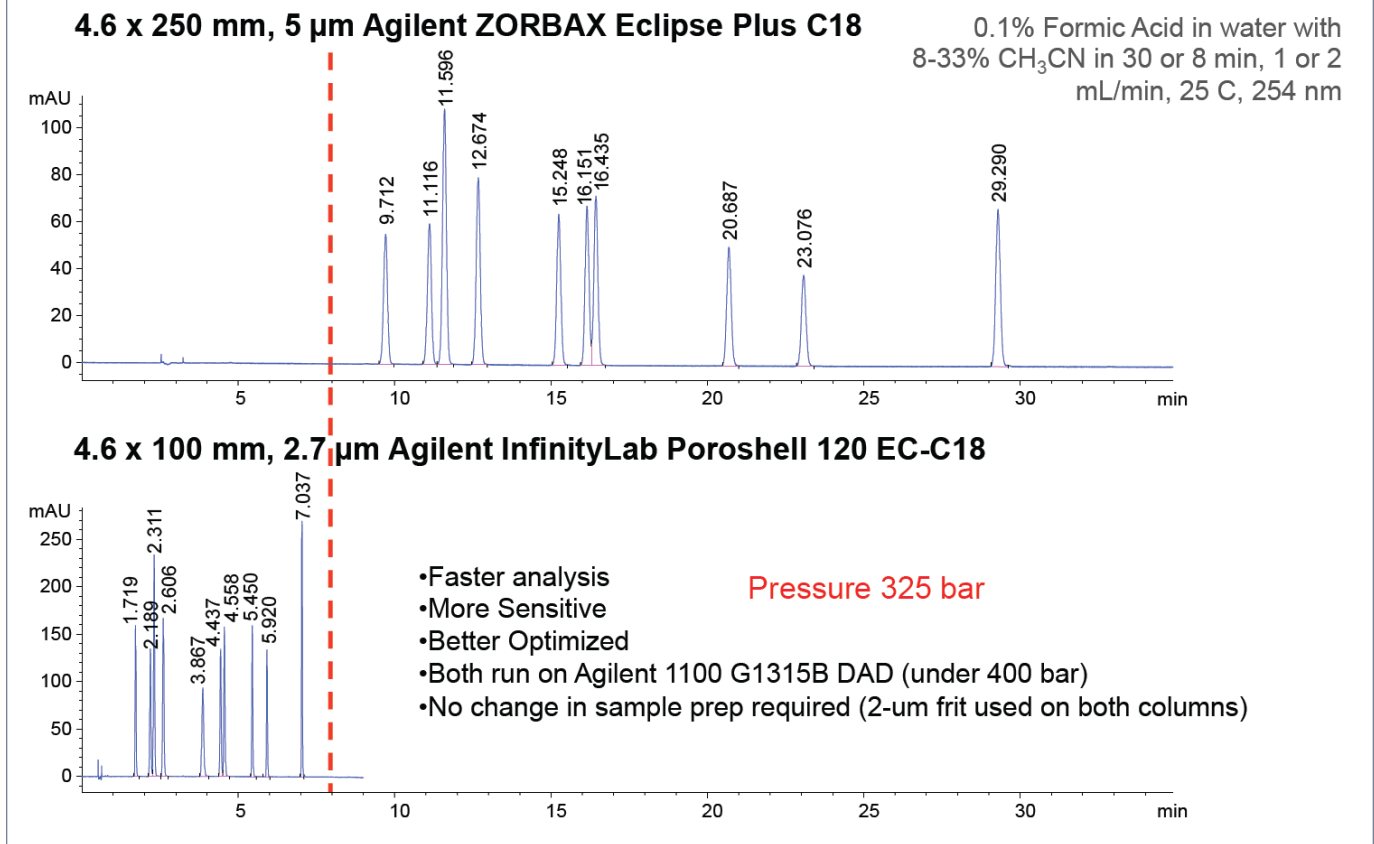
컬럼은 2.05의 분리능을 얻었고, 나머지 2개 컬럼에서는 조금 더 낮은 분리능인 2.03과 1.99를 나타냈습니다. 분석법의 목적 중 하나가 최소 분리능 2.0을 유지하여 분석을 수행하는 것이었기 때문에, 이동상에 물을 소량 더 추가하고 acetonitrile 함량을 65%에서 60%로 줄였습니다. 이 미세한 조정을 통해 분리능은 각 3개의 컬럼에서 2.55, 2.54, 2.56으로 증가하여 견고한 분석법을 확보하였습니다.

새로운 컬럼 기술 제대로 활용하기

새로운 컬럼과 같은 최신 기술을 테스트하는 것은 분석법을 개선하기 위한 또 하나의 생산적인 방법입니다. 예를 들어, 애질런트는 C18 컬럼의 새로운 표면 처리법을 개발하여,



그림 4: 설파제 분리 스케일링 결과(5 μ m Zorbax에서 2.7 μ m InfinityLab Poroshell 120 컬럼으로 전환)



피크 테일링을 줄이고 높은 pH에서 선택성 변화 없이 그 안정성도 향상시켰습니다. 뿐만 아니라, InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 및 Eclipse Plus와 같은 표면 다공성 컬럼의 개발을 통해 보다 낮은 압력, 보다 높은 성능 및 보다 적은 시료 전처리와 같은 이점을 제공합니다.

그림 3은 간단히 전처리 한 nortriptyline 및 dipropyl phthalate 시료를 Eclipse Plus 및 기타 C18 컬럼에서 고객의 기존 분석법과 25mmol, pH 7.4의 phosphate 완충액을 이용하여 분석한 결과를 보여줍니다. Eclipse Plus의 개선된 결합상은 더 우수한 감도, 뾰족한 피크, 향상된 분리능 및 보다 평평한 베이스라인 결과를 제공하였습니다.

애질런트는 "HPH"(높은 pH 안정성)라는 InfinityLab Poroshell 컬럼을 개발하였습니다. 이 컬럼은 pH 변화를 이용해 분리의 선택성을 조절합니다. 이 컬럼의 파생 제품은 InfinityLab Poroshell HPH C18 컬럼이고, 이는 phosphate 완충액에서 우수한 성능을 유지하는 동시에 기존 컬럼보다 더 긴 수명을 자랑합니다. 복잡한 시료를 다루는 분석법도 최소한의 조정을 통해 이 컬럼으로 전환 가능하며, 비슷한 선택성을 유지하고 중간 pH 범위에서 우수한 컬럼 수명을 갖는 추가적인 이점을 누릴 수 있습니다.

로터 씰(seal)의 고려 사항은 아래와 같습니다. 높은 pH 이동상 사용 시, 기기의 일부 부품이 손상될 수 있습니다. 주입기 밸브와



그림 5: US 약전에 따른 등용매 및 그레디언트 분리별 허용 가능한 분석법 조정 사항

Parameters for System Suitability	USP34	USP37-NF32S1	
	Isocratic/Gradient	Isocratic	Gradient
Particle Size	-50%	L/dp: -25% to +50% or N: -25% to +50%	No Changes allowed
Column Length	±70%		
Column Inner Diameter	Flexible, w/ constant linear velocity	Flexible, w/ constant linear velocity	No Changes allowed
Flow rate	Based on column dimension: $F_2 = F_1 \times [(I_2 \times d_p^2) / (I_1 \times d_1^2)]$ Additional adjustments: ±50%	Based on dp: $F_2 = F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1) / (dc_1^2 \times dp_2)]$ Additional adjustments: ±50%, provided N decreases ≤20%	No Changes allowed
Injection volume	May be reduced, as far as is consistent with precision and detection limits; increase not permitted	May be adjusted, as far as is consistent with precision and detection limits	May be adjusted, as far as is consistent with precision and detection limits
Column Temperature	±10°C	±10°C	±10°C
Mobile phase pH	±0.2 units	±0.2 units	±0.2 units
Salt Concentration	within ±10% if the permitted pH variation is met	within ±10% if the permitted pH variation is met	within ±10% if the permitted pH variation is met
Ratio of Components in Mobile Phase	Minor component (≤50%): ±30% relative, but cannot exceed ±10% absolute; may only adjust 1 minor component in ternary mixtures	Minor component (≤50%): ±30% relative, but cannot exceed ±10% absolute; may only adjust 1 minor component in ternary mixtures	No Changes allowed * * Not specified in <621>, assume no changes are allowed
Wavelength of UV-Visible Detector	No changes allowed	No changes allowed	No changes allowed

여타 밸브에서 발견할 수 있는 로터 씰(seal)은 polyimide재질(Vespel)로 만들어져있으며, hydroxide 또는 ammonium carbonate와 같은 10 이상의 pH에서는 쉽게 공격을 당할 수 있습니다. 장시간 높은 pH의 이동상 사용 시에는 Vespel 대신 PEEK 재질의 로터 씰(seal)을 사용할 수 있습니다.

표면 다공성 컬럼을 이용한 개선 사항

완전 다공성 컬럼을 InfinityLab Poroshell 120과 같은 표면 다공성 컬럼으로 교체하는 것은 분석법 개선을 위한 또 다른 옵션입니다.

그림 4는 5µm Agilent ZORBAX Eclipse Plus 컬럼에서 2.7µm InfinityLab Poroshell 120 컬럼으로 전환한 설파제의 분리 결과를 보여줍니다. InfinityLab Poroshell에서 모든

10개 피크가 약 7분 내에 용리되었는데, 이는 더 긴 컬럼에서 첫 번째 피크가 용리되기 전에 해당하는 시간입니다. 감도 또한 향상되었습니다. 더 적은 시료 주입에도 불구하고 신호 대 잡음비는 더 높아져 보다 뾰족하고 압축된 피크가 나타났으며, 이는 추가적인 최적화에 이상적입니다. 시료 전처리를 변화시킬 필요 없이, 두 분리는 모두 400bar이하의 압력에서 수행할 수 있습니다.

미국 약전(USP) 내의 분석법과 같은 다수의 약전 분석법은 잠정적으로 업그레이드할 수 있습니다. USP는 허용할 수 있는 조정에 관한 가이드라인을 제공합니다(**그림 5**). 등용매 분석법에서, 컬럼 길이(L)와 입자 직경(dp)의 비율을 본래 값 대비 -25% ~ +50%로 유지하거나, 이론단수(N)가 그 비율 내에 있으면, 다시 밸리데이션을 수행하지 않아도



됩니다. 선속도가 일정하게 유지되는 한 이와 같은 분석법 변경의 유연성은 허용됩니다. 주입 부피 또한 검출 한계를 충족하기 위해 변경할 수 있습니다.

그레디언트 분석에서는 다시 밸리데이션을 거치지 않고 변경할 수 있는 부분이 거의 없지만, 현재 USP는 허용 가능한 조정을 조사하고 있습니다.

간단한 분석법 스케일링

Naproxen에 대한 USP 분석법을 5µm 완전 다공성 재질(Agilent ZORBAX Eclipse Plus)로부터 2.7µm 표면 다공성 재질(Agilent InfinityLab Poroshell 120)로 스케일링하였습니다. 표준 분석법의 값은 $N = 10,639$, $R_s = 13.7$ 및 L/dp 비 = 30,000 이었습니다. 분석법을 4.6mm x 100mm 컬럼으로 변경한 경우, N 을 거의 100% 향상하였으나, L/dp 비는 단지 23% 향상에 그쳤으며, 이는 USP의 허용 가능한 분석법 조정 요건을 충족하였습니다. 보다 짧은 컬럼(4.6mm x 50mm)의 사용을 시도한 결과, N 은 10,639에서 11,281로 증가하였으며, 분석법에 기술된 분리능은 유사하게 유지되었습니다($R_s > 11.5$).

Poroshell 입자는 같은 제품군 내에서 스케일링 가능합니다. 애질런트는 응용의 유형에 따라 특정 컬럼 공극 크기를 사용하는 것을 권장합니다. 단순히 HPLC 성능을 개선하고자 할 때는 4µm 컬럼을 사용하면 충분하며, 이는 5µm 완전 다공성 컬럼에 비해 성능을 약 200% 향상시킬 수 있습니다. 2.7µm 컬럼은 상당히 낮은 압력에서 UHPLC 성능을

제공하는 워크호스입니다. 이들 컬럼은 이제 1,000bar에서 사용 가능하고, sub-2µm 완전 다공성 입자 컬럼의 약 50%에 해당하는 일반 압력을 보이며, 또한 추가 시료 전처리 필요 없이 약 90% 가량의 효율을 제공합니다. 1.9µm 컬럼은 sub-2µm 완전 다공성 입자 컬럼과 비슷하게 극도로 높은 초고성능 UHPLC 성능과 압력을 제공하며 sub-2µm 완전 다공성 입자 컬럼 대비 120% 효율을 성취할 수 있습니다.

LC 분석법의 LC-MS로의 전환

질량 분석(MS)은 극성에서부터 비극성이 강한 화합물에 이르기까지 폭넓은 분석에서 사용합니다. 전자분무 이온화(ESI)는 고분자량과 저분자량 화합물 모두에 대해 MS에서 사용할 수 있으므로, 다양한 시료에 적합합니다. 단, 보다 비극성인 시료는 전하 유도의 효율성이 떨어져 생성된 신호가 적기 때문에 ESI의 사용을 피해야 합니다. 이러한 화합물은 대기압 광이온화(APPI) 또는 대기압 화학 이온화(APCI)를 사용할 수 있습니다.

ESI는 많은 경우에 널리 사용되며, 미지 화합물 식별은 분석법 개발의 목표입니다. 또한 LC-MS 장비의 사용이 쉬워지고 실험실에서 바로 이용할 수 있게 됨에 따라, MS에 적합한 분석법 개발이 더욱 요구되고 있습니다.



스폰서 콘텐츠

LC 핸드북: LC 컬럼 및 분석법 개발 가이드



ESI-MS를 위한 분석법 고려 사항은 아래와 같습니다.

- 이동상의 pH(및 분석물질 pKa)가 이온 형성 및 신호에 영향을 미침
- 전자분무 프로브에 가하는 전압이 이온 형성을 유도함
- 최적의 이동상 pH를 선택하여 선택성 향상 가능
- 유기 용매는 이온화에 거의 영향을 주지 않지만, 기화에 영향을 미치므로 휘발성이 높은 이동상의 사용이 보다 유리할 수 있음
- ESI는 0.5mL/분 이하의 유속에서 가장 잘 작동함
- ESI는 역상, 소수성 상호작용, 순상 HPLC와 호환 가능

ESI 완충액의 고려 사항은 아래와 같습니다.

- 신호 감쇠 효과를 피하기 위해 25mM 이하의 완충액 농도를 권장(이상적으로는 10mM 이하)
- 침전물 축적으로 인해, 금속 이온 완충액은 이온화 간섭으로 인해 ESI와의 호환성이 좋지 않음

- 산성 이동상은 일반적으로 양이온 모드에 적합
 - o 0.1 ~ 1% formic acid, 0.1 ~ 1% acetic acid, 0.05 ~ 0.2% TFA
 - o Ammonium 염은 ammonium 부가물 형성에 유리
 - o TFA는 이온 억제를 일으킴
 - o TFA "fix"사용 - 컬럼 이후 유로에 acetic acid 또는 propionic acid 첨가

- 염기성 이동상은 음이온 모드에 적합

Phosphoric acid 기반의 이동상과 acetonitrile을 이용해 녹차 내 10종 화합물의 분리를 수행하였습니다(Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6mm x 150mm 컬럼). 분리는 5µm 컬럼에서 약 15분 이내로 잘 수행되었습니다. 하지만 인산은 MS 친화적이지 않고, 분석법의 목표는 분리 속도의 향상이었습니다.

비슷한 선택성을 보유한 Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 컬럼에서 분리를 수행함으로써, 약 60%의 역압 조건에서 분리를 완성하였습니다. 0.2% formic acid, 0.2% acetic acid 및 0.02% TFA를 사용하여 동일한 선택성을 얻을 수 있었으며, 또는 formic acid으로 조정한 ammonium formate 완충액을 사용하여 비슷한 분리능을 성취할 수 있었습니다.

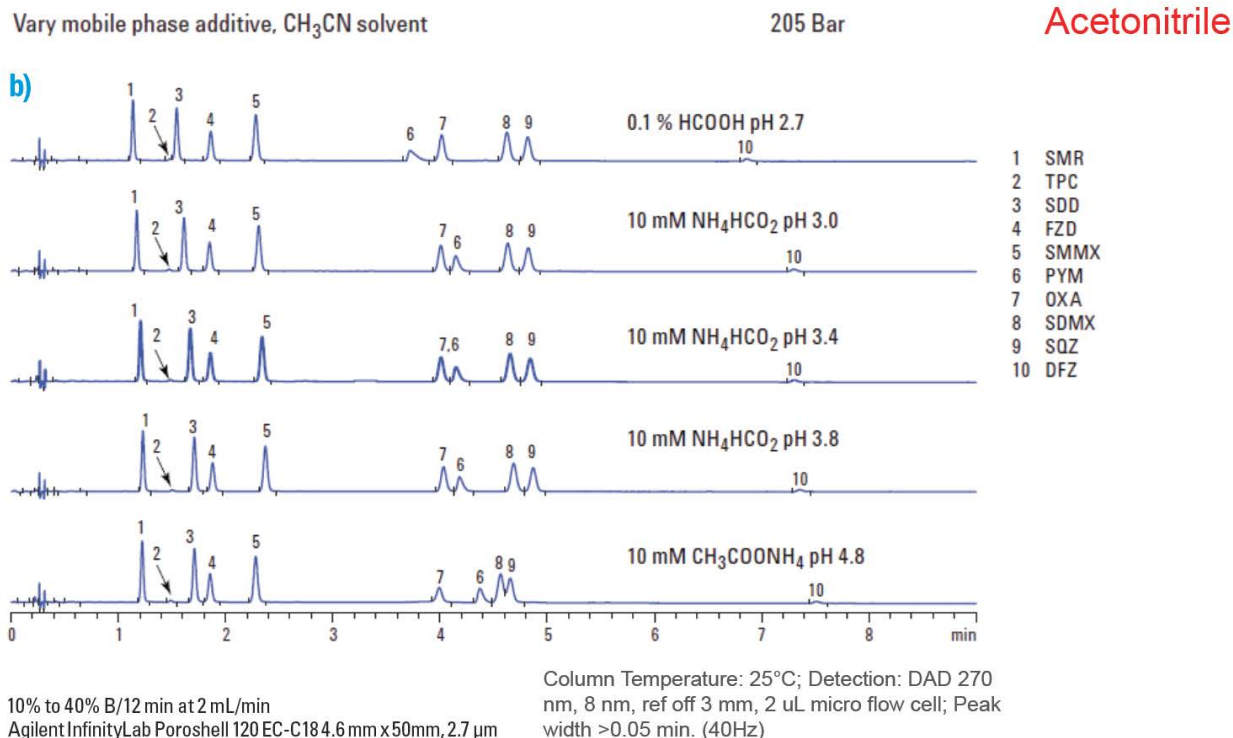
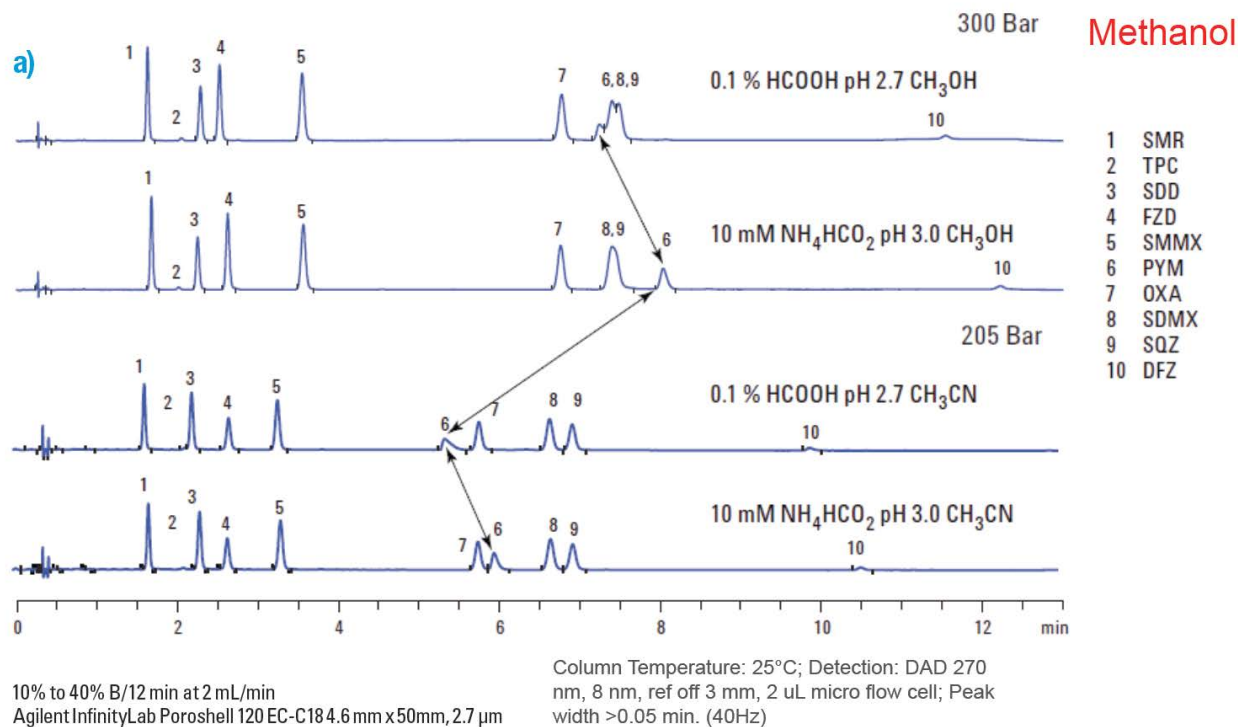
MS 감도는 이러한 선택에 의해 큰 영향을 받았습니다. 분리 평가의 방법으로 하나의 특정 피크를 조사한 결과, acetic acid 사용 시 S/N = 155대비 TFA 사용 시 S/N = 68로 나타났으며,

스폰서 콘텐츠

LC 분석법 개발 자동화 웨비나 시리즈



그림 6: 기존 항생제 분석법의 MS로의 이전. a) methanol 이동상 사용, b) acetonitrile 이동상 사용





완충액을 포함한 이동상 사용 시 S/N = 33에 불과했습니다. 때문에 이 경우에는 acetic acid가 가장 적합한 선택이었으며 분석법을 빠르게 최적화할 수 있었습니다.

데이터 수집 속도 역시 최적화 과정에서의 고려 사항입니다. 빠른 데이터 수집은 가장 좁은 피크를 생성하여 최적화된 피크 용량을 나타낼 수 있지만, 한편으로 베이스라인 노이즈의 증가 및 S/N 감도의 감소를 야기할 수 있습니다. 조금 느린 데이터 수집 속도에서 최적의 S/N를 얻을 수 있으나, 그 대가로 피크 용량이 감소할 수 있습니다. 따라서 데이터 수집 속도는 특정 분석법의 목표에 따라 다르게 최적화해야 합니다.

MS에 적합한 새로운 분석법 개발은 또 다른 방식의 접근입니다. 예를 들어, 동물 치료용 항생제 분리를 위한 기존의 UV 분석법에서는 10종 화합물을 우수하게 분리하였습니다. 그러나 이 분석법에서는 매우 높은 농도의 phosphoric acid를 사용하였고 분석 시간은 35분에 달했습니다. 동등하게 사용할 수 있는 컬럼이 없었기 때문에, methanol 또는 acetonitrile이 10 ~ 40%로 변화하는 일반 그레디언트로 새로운 분석법을 개발하였습니다. 짧은 4.6 x 50mm, 2.7-µm InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 컬럼 및 UV 검출을 사용함으로써 formic acid, ammonium formate, acetic acid 및 ammonium acetate를 이동상 완충액으로 사용하는 이동상의 다양한 조합을 빠르게 스크리닝 할 수 있었습니다.

그림 6a의 methanol 분석에서 볼 수 있듯이, 피크는 사용한 완충액 유형에 따라 크게 이동하였습니다. Acetonitrile(**그림 6b**) 사용 시, 피크 이동은 보다 적었으며, 압력은 훨씬 낮았습니다. 용리 순서와 피크 간격을 변화시키기 위해 pH를 조절하였습니다. 최적의

이동상 조합은 pH 3.8의 ammonium formate와 acetonitrile로서, 이 조합에서 10종 화합물의 우수한 분리 결과가 나타났습니다. MS 검출용 분석법을 최적화하기 위해 유속을 0.42mL/분으로 높였습니다.

이 분석법은 UV 또는 MS 검출에 사용할 수 있는 3mm x 50mm 컬럼으로 성공적인 스케일링을 할 수 있었습니다. 분리 속도는 빠르고, 용매 소모량은 본래의 분석법보다 훨씬 적습니다.

결론

대부분의 실험실은 현재의 LC 분석법을 검토하면서 간단한 조정으로 크로마토그래피 결과를 개선하거나 해당 분석법을 MS 친화적으로 전환할 수 있는지를 판단함으로써 이점을 누릴 수 있습니다. 컬럼 선택은 성공적인 분석의 매우 중요한 요소이며, 많은 경우 최신 컬럼 케미스트리를 대안적인 선택성으로 활용함으로써 분리능 향상과 보다 우수한 피크 모양을 획득할 수 있습니다.

참고 문헌

1. J. Dolan, *LCGC* **31**(1), 30-35 (2013).



William Long
LC 컬럼 응용 분석 연구자
애질런트 테크놀로지스



데이터 무결성 요건 충족과 생산성 향상을 동시에

애질런트 OpenLab CDS로 업그레이드하기

데이터 시스템을 잘 선택하면 모든 것이 달라질 수 있습니다. OpenLab CDS는 크로마토그래피 및 SQ MS 워크플로를 위한 단일 보안 크로마토그래피 데이터 시스템으로 실험실 운영을 원활하게 하고 고품질의 결과를 효율적으로 생성합니다.

OpenLAB CDS는 감사 추적 리뷰, 액세스 권한 제어, 기록 보호, 전자 서명 등 기술적인 제어를 통해 데이터 무결성을 보장하고 까다로운 규제를 충족할 수 있습니다.

Agilent OpenLab CDS에 대해 더 자세히 알아보십시오.

www.agilent.com/chem/openlabcds-streamline